UNTERSUCHUNGEN ZUR SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUR-ANORDNUNG DER RIBOSOMALEN RNAs IM ESCHERICHIA COLI RIBOSOM DURCH INTRAMOLEKULARE QUERVERNETZUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
JOHANNES ATMADJA
aus Kalisat, Indonesien
1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0001

UNTERSUCHUNGEN ZUR SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUR-ANORDNUNG DER RIBOSOMALEN RNAs IM *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOM DURCH INTRAMOLEKULARE QUERVERNETZUNGEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
JOHANNES ATMADJA
aus Kalisat (Indonesien)

1. Gutachter : Prof. Dr. H.G. Wittmann
2. Gutachter : Prof. Dr. V.A. Erdmann

Promoviert am : 22. 4. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

		SEITE :
1.	ZUSAMMENFASSUNG	5
2.	EINLEITUNG	
2.1.	Ribosomale Komponenten	8
2.1.1.	Ribosomale RNA	9
2.1.2.	Ribosomale Proteine	15
2.2.	Funktion der Ribosomen	16
2.3.	Topographie der Ribosomen von E. coli	21
2.3.1.	Umriß und Größe der Ribosomenbestandteile	21
2.3.2.	Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Ribosomen und ihrer Bestandteile	23
2.3.2.1.	Untersuchungen an den ribosomalen Proteinen	24
2.3.2.2.	Untersuchungen an der ribosomalen RNA	28
3.	MATERIALIEN & GERÄTE	
3.1.	Materialien	33
3.1.1.	Bakterienstamm	33
3.1.2.	Proteine (Enzyme)	33
3.1.3.	Transfer RNA	33
3.1.4.	Radiochemikalien (Isotopen)	33
3.1.5.	Feinchemikalien	34
3.1.6.	Oligodesoxyribonukleotide	35
3.1.7.	Verschiedenes	35
3.2.	Geräte	36
4.	METHODEN	
4.1.	Allgemeine Methoden	37
4.1.1.	Reinigen von Glasgeräten und Puffern	37
4.1.2.	Radioaktivitätsmessungen	37
4.1.3.	Autoradiographie	37
4.2.	Präparation von ^{32}P markierten Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten	38
4.2.1.	Dichtegradienten-Zentrifugation	39

4.2.2.	Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung der 70S Ribosomen und ihrer Untereinheiten	39
4.2.3.	Dichtegradienten-Zentrifugation zur Trennung der quervernetzten 70S Ribosomen	40
4.3.	Dialyseschritte zur Vorbereitung der Vernetzungsreaktionen	41
4.3.1.	Dialyse vor der Quervernetzungsreaktion der 70S Ribosomen mit N-Lost	41
4.3.2.	Dialyse vor der Quervernetzungsreaktion der 30S ribosomalen Untereinheiten mit N-Lost	41
4.3.3.	Dialyse vor der Quervernetzungsreaktion durch ultraviolette Bestrahlung	42
4.4.	Vernetzungsreaktionen	42
4.4.1.	Durchführung der Quervernetzungsreaktion mit N-Lost	43
4.4.1.1.	Vernetzungsreaktion mit N-Lost als Reagenz in 70S Ribosomen ("Interface"-Quervernetzungsreaktion)	43
4.4.1.2.	Vernetzungsreaktion mit N-Lost als Reagenz innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten	43
4.4.2.	Vernetzungsreaktion durch ultraviolette Bestrahlung der 30S ribosomalen Untereinheiten	44
4.4.3.	Vernetzungsreaktion durch *in vivo* UV-Bestrahlung der 30S ribosomalen Untereinheiten	44
4.5.	Enzymhydrolyse	45
4.5.1.	Partielle RNA-Hydrolyse innerhalb der ribosomalen Untereinheiten mit RNase V_1	45
4.5.2.	Proteinhydrolyse	46
4.5.3.	Partielle RNA-Nachhydrolyse der vernetzten 16S RNA mit RNase H	46
4.5.4.	Partielle RNA-Hydrolyse der mit N-Lost vernetzten 70S Ribosomen mit RNase V_1	47
4.5.5.	Partielle RNA-Nachhydrolyse mit RNase T_1	48
4.6.	Polyacrylamid- (PAA-) Gelelektrophorese	48
4.6.1.	PAA-Vertikal Gelelektrophorese	48
4.6.1.1.	3 - 15% (w/v) PAA-Gradientengel mit 0,2%	

	(w/v) SDS zur Trennung der hydrolysierten RNA-Fragmente	49
4.6.1.2.	2D-Gelelektrophorese zur Trennung der quervernetzten RNA-Fragmente	50
4.6.1.3.	2 1/2 - 7 1/2% (w/v) PAA-Gradientengel mit SDS, EDTA zur Analyse der "Interface"-Quervernetzungsreaktion	51
4.6.2.	10% (w/v) Polyacrylamidgel mit Harnstoff zur Reinigung der nachhydrolysierten RNA	52
4.6.2.1.	3% (w/v) PAA-Gel mit SDS, EDTA und Harnstoff zur Prüfung der RNA-Unversehrtheit	53
4.6.3.	10% (w/v) PAA-Gel mit SDS und EDTA zur Trennung der nachhydrolysierten RNA	53
4.7.	Extraktion der RNA aus dem Polyacrylamidgel	54
4.8.	Analyse der Quervernetzung in der RNA	55
4.8.1.	Oligonukleotidanalyse: Fingerprintanalyse	55
4.8.2.	Sekundäranalyse	56
4.8.3.	Tertiäranalyse	58
4.9.	Raummodellbau der RNA-Moleküle	58
5.	ERGEBNISSE	
5.1.	Intramolekulare RNA Vernetzung in 30S ribosomalen Untereinheiten	61
5.1.1.	Quervernetzung durch UV-Bestrahlung innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten	61
5.1.1.1.	Isolierung der durch UV-Bestrahlung vernetzten 16S RNA-Fragmente	62
5.1.1.2.	Analyse der durch UV-Bestrahlung vernetzten 16S RNA-Fragmente	62
5.1.2.	Quervernetzungsreaktion mit N-Lost als Reagenz innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten	88
5.1.2.1.	Isolierung der durch N-Lost vernetzten 16S RNA-Fragmente	89
5.1.2.2.	Analyse der durch N-Lost vernetzten 16S RNA-Fragmente	92
5.2.	Quervernetzungsreaktionen innerhalb der 70S Ribosomen mit N-Lost als Reagenz	105

.2.1. Nachweis der durch N-Lost induzierten Vernetzungen innerhalb der 70S Ribosomen 105

.2.2. Analyse des durch N-Lost vernetzten 23S RNA-Fragments 110

.3. Untersuchung der durch UV-Bestrahlung induzierten in vivo Vernetzungen innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten 113

. DISKUSSION

.1. RNA-RNA Vernetzungen innerhalb der ribosomalen Untereinheiten 116

.2. Analyse der durch UV-Bestrahlung induzierten RNA-RNA Vernetzungen innerhalb der 16S RNA 118

.3. Analyse der durch N-Lost induzierten RNA-RNA Vernetzungen innerhalb der 16S RNA 128

.4. Analyse der durch N-Lost induzierten RNA Vernetzungen in 70S Ribosomen 132

.5. Dreidimensionaler Raummodellbau 135

. ABKÜRZUNGEN 142

. LITERATURVERZEICHNIS 144

DANKSAGUNG 153

LEBENSLAUF 154

1. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte die Faltung des RNA-Moleküls in den Untereinheiten der E. coli Ribosomen untersucht werden. Dazu wurden benachbarte RNA-Bereiche mit einem kurzen Vernetzungsreagenz irreversibel miteinander verbunden. Die 30S ribosomalen Untereinheiten wurden entweder mit Hilfe milder ultravioletter Strahlung oder durch das Reagenz Bis-(2-chlorethyl)-methylamin, das sogenannte "Stickstoff-Lost"/N-Lost quervernetzt. Mit dem gleichen Reagenz wurde versucht, die Topographie der Grenzfläche zwischen den ribosomalen Untereinheiten in den 70S Ribosomen durch RNA-RNA Quervernetzungen aufzuklären. Nach der Quervernetzungsreaktion wurden die Untereinheiten mit RNase V_1 (aus Naja naja oxiana) partiell hydrolysiert und anschließend in einigen Fällen weiter mit RNase H nachhydrolysiert; dafür wurden Hexadesoxyribonukleotide d-(CTTCCC) als Substrat verwendet. Die ribosomalen Proteine wurden vollständig hydrolysiert und die vernetzte RNA in einem zweidimensionalen Gelelektrophoresesystem getrennt. Anschließend wurde die Vernetzungsstelle im "mini finger-print" System nach Volkaert und Fiers (1977) analysiert, sequenziert und identifiziert.

Durch milde ultraviolette Bestrahlung oder durch eine Reaktion mit N-Lost wurden in der 16S RNA mehrere Vernetzungsstellen erzielt, wobei es sich sowohl um sekundäre (+) als auch um tertiäre (*) Strukturvernetzungen handelte. Die sekundären Strukturvernetzungen sind innerhalb der Sekundärstruktur liegende Vernetzungen; die tertiären Strukturvernetzungen verbinden Bereiche, die in der Primär- und Sekundärstruktur weit entfernt liegen, in der Tertiärstruktur aber aber dicht benachbart liegen.

UV Vernetzungsstellen innerhalb der 16S RNA (Basennummern nach Brosius et al., 1978):

1*)	31	mit	48
2*)	36 - 42	mit	1058 - 1064#
3*)	1090 - 1094	mit	1161 - 1164
4*)	1125 - 1127	mit	1280 - 1281
5+)	497	mit	546 - 548
6+)	1238 - 1240	mit	1298

#Diese Quervernetzungsstelle konnte nicht genau identifiziert werden. Als eine mögliche tertiäre Strukturvernetzung wurde eine Vernetzung zwischen den Oligonukleotiden 36-42 und 1058-1064 vorgeschlagen.

N-Lost Vernetzungsstellen innerhalb der 16S RNA:

1*)	31	mit	305 - 306
2*)	148	mit	174
3+)	1413	mit	1487

Die Vernetzung zwischen den Oligonukleotiden 1125-1127 und 1280-1281 ist die erste weitauseinander liegende ("long range") Vernetzungsstelle innerhalb der 16S RNA, die durch UV-Bestrahlung erzielt worden ist. Sie stellt eine Wechselwirkung von zwei in der Primär- und Sekundärstruktur weit entfernt liegenden Bereichen dar, die aber innerhalb des RNA Moleküls räumlich dicht benachbart liegen.

Um die Frage zu klären, welche Ähnlichkeit die RNA-Struktur mit der Strukur der Ribosomen *in vivo* zum Zeitpunkt der Vernetzung aufweist, wurde die UV-Bestrahlung der 30S ribosomalen Untereinheiten *in vivo* durchgeführt. Hierzu wurden die *E. coli* Zellen, deren Wachstum vorher gestoppt worden war, direkt mit UV-Licht bestrahlt. Dabei wurden die gleichen sekundären (+) und tertiären (*) Strukturvernetzungen wie im Falle der *in situ* UV-Vernetzungen gefunden:

1*)	31	mit	48
2+)	497	mit	546 - 548
3+)	1238 - 1240	mit	1298

Durch Quervernetzungsreaktionen mit Bis-(2-chlorethyl)-methylamin wurde versucht, die Kontakte zwischen der 16S und der 23S RNA an der Grenzfläche der Untereinheiten im 70S Ribosom zu analysieren. Dies gelang jedoch nicht. In diesem Falle konnte eine Vernetzungsstelle nur innerhalb der 23S RNA nachgewiesen werden (Basennummern nach Brosius et al., 1980):

2811 mit 2890

Um sich die räumliche Anordnung der ribosomalen RNA innerhalb der Ribosomen vorstellen zu können, wurden Draht-Raummodelle der Sekundärstruktur von der 5S- (nach Woese et al., 1980), 16S- (nach Maly und Brimacombe, 1983) und 23S-RNA (nach Maly und Brimacombe, 1983) gebaut. Die Ergebnisse der Vernetzungen wurden in diese Modelle übertragen, um nun allmählich aus der sekundären eine dreidimensionale Struktur der RNA zu entwickeln. Die daraus gewonnene Information für die Topographie der Ribosomen wurde dabei diskutiert.

2. EINLEITUNG

Proteine, deren Aminosäuresequenz in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) codiert ist, werden in allen Zellen von Bakterien, Pflanzen und Tieren in sehr ähnlichen Organellen, den Ribosomen, synthetisiert. Dazu wird zuerst die DNA in eine einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA), die Boten-RNA oder mRNA, kopiert. Die mRNA ist das Programm, das von den Ribosomen entziffert und in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt wird. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet. Je drei Nukleotide bilden die Informationseinheit - das Codon - für eine Aminosäure, wobei für alle Lebewesen ein nahezu universeller genetischer Code gilt (M. Ycas, 1969).

Zum Verständnis des Translationsvorganges ist es zunächst wichtig zu wissen, welche Komponenten daran beteiligt sind und wie diese miteinander interagieren, wie sie in der Zelle synthetisiert werden und wie sie aussehen.

2.1. Ribosomale Komponenten

Die Ribosomen der Pro- und Eukaryonten sind Protein-Nukleinsäure-Komplexe und bestehen aus zwei Untereinheiten. Das eubakterielle *E. coli* Ribosom weist einen Sedimentationskoeffizienten von 70S auf und hat ein Molekulargewicht von $2,4 \times 10^6$ Dalton (van Holde und Hill, 1974). Das Ribosom dissoziiert (nach Ablesung der mRNA) in eine 30S ($0,9 \times 10^6$ Dalton) und eine 50S ($1,5 \times 10^6$ Dalton) ribosomale Untereinheit; *in vitro* findet die Dissoziation bei Mg^{2+}-Konzentrationen unter 5 mM statt. Die 30S Partikel enthalten ein 16S RNA Molekül (1542 Nukleotide) und 21 verschiedene Proteine (S1 - S21), die große 50S Untereinheit enthält ein 23S RNA Molekül (2904 Nukleotide), ein 5S RNA Molekül (120 Nukleotide) und 32 verschiedene Proteine (L1 - L34).

2.1.1. Ribosomale RNA

Wie oben bereits erwähnt, enthalten bakterielle Ribosomen drei RNA Moleküle, nämlich die 5S, 16S und 23S RNA. Die Primärsequenzen der 5S RNA (120 Nukleotide) wurden von Brownlee et al. (1967) aufgeklärt. Fox und Woese (1975) haben unter anderem mit der phylogenetischen Vergleichsmethode ein Sekundärstrukturmodell der 5S RNA vorgeschlagen. Erweiterte Sekundär- und Tertiärstrukturmodelle der 5S RNA wurden in darauffolgenden Jahren von verschiedenen Gruppen vorgeschlagen (Erdmann et al., 1980; Garrett et al., 1981; Hancock und Wagner, 1982). Erst durch Fortschritte bei den Sequenzierungsmethoden der Ribonukleinsäuren (DNA und RNA) konnten die Primärsequenzen der 16S RNA (1542 Nukleotide) unabhängig voneinander durch Brosius et al. (1978) und Carbon et al. (1978), und die von der 23S RNA (2904 Nukleotide) ebenfalls durch Brosius et al. (1980) aufgeklärt werden. In Abb. 1 und Abb. 2 sind die Primärsequenzen der 16S- (Brosius et al., 1978) und 23S RNA (Brosius et al., 1980) abgebildet. Die Aufklärung der Primärsequenzen führte zum Aufbau der Sekundärstrukturmodelle der RNA Moleküle. Durch verschiedene experimentelle Methoden (u.a. durch die chemische Modifizierung der Basen, die limitierte Hydrolyse mit einzelstrang- oder mit doppelstrang-spezifischen RNasen, die Isolierung und Sequenzierungsanalyse der doppelsträngigen RNA) und dem oben bereits erwähnten phylogenetischen Vergleich wurden drei verschiedene Sekundärstrukturmodelle der 16S und 23S RNA vorgeschlagen (Übersicht bei Brimacombe et al., 1983; Woese et al., 1983): für die 16S RNA von Noller und Woese (1981), Zwieb et al. (1981) und Stiegler et al. (1981); für die 23S RNA von Noller et al. (1981), Glotz et al. (1981) und Branlant et al. (1981).

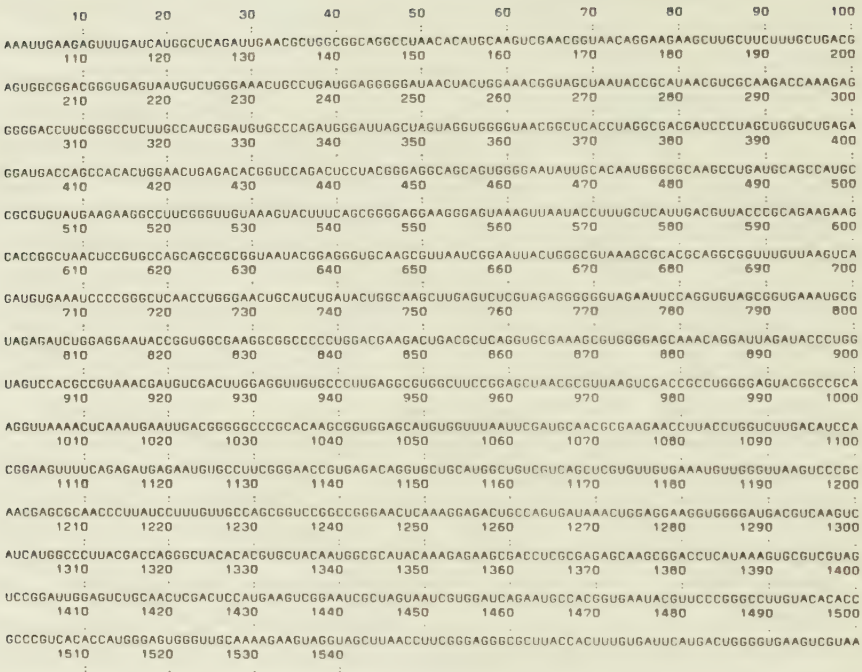

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
AAAUUGAAGAGUUUGAUCAUGGCUCAGAUUGAACGCUGGCGGCAGGCCUAACACAUGCAAGUCGAACGGUAACAGGAAGAAGCUUGCUUCUUUGCUGACG
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
AGUGGCGGACGGGUGAGUAAUGUCUGGGAAACUGCCUGAUGGAGGGGGAUAACUACUGGAAACGGUAGCUAAUACCGCAUAACGUCGCAAGACCAAAGAG
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GGGGACCUUCGGGCCUCUUGCCAUCGGAUGUGCCCAGAUGGGAUUAGCUAGUAGGUGGGGUAACGGCUCACCUAGGCGACGAUCCCUAGCUGGUCUGAGA
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
GGAUGACCAGCCACACUGGAACUGAGACACGGUCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUGGGGAAUAUUGCACAAUGGGCGCAAGCCUGAUGCAGCCAUGC
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
CGCGUGUAUGAAGAAGGCCUUCGGGUUGUAAAGUACUUUCAGCGGGGAGGAAGGGAGUAAAGUUAAUACCUUUGCUCAUUGACGUUACCCGCAGAAGAAG
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
CACCGGCUAACUCCGUGCCAGCAGCCGCGGUAAUACGGAGGGUGCAAGCGUUAAUCGGAAUUACUGGGCGUAAAGCGCACGCAGGCGGUUUGUUAAGUCA
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
GAUGUGAAAUCCCCGGGCUCAACCUGGGAACUGCAUCUGAUACUGGCAAGCUUGAGUCUCGUAGAGGGGGGUAGAAUUCCAGGUGUAGCGGUGAAAUGCG
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
UAGAGAUCUGGAGGAAUACCGGUGGCGAAGGCGGCCCCCUGGACGAAGACUGACGCUCAGGUGCGAAAGCGUGGGGAGCAAACAGGAUUAGAUACCCUGG
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
UAGUCCACGCCGUAAACGAUGUCGACUUGGAGGUUGUGCCCUUGAGGCGUGGCUUCCGGAGCUAACGCGUUAAGUCGACCGCCUGGGGAGUACGGCCGCA
910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
AGGUUAAAACUCAAAUGAAUUGACGGGGGCCCGCACAAGCGGUGGAGCAUGUGGUUUAAUUCGAUGCAACGCGAAGAACCUUACCUGGUCUUGACAUCCA
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
CGGAAGUUUUCAGAGAUGAGAAUGUGCCUUCGGGAACCGUGAGACAGGUGCUGCAUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUUGUGAAAUGUUGGGUUAAGUCCCGC
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
AACGAGCGCAACCCUUAUCCUUUGUUGCCAGCGGUCCGGCCGGGAACUCAAAGGAGACUGCCAGUGAUAAACUGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAGUC
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
AUCAUGGCCCUUACGACCAGGGCUACACACGUGCUACAAUGGCGCAUACAAAGAGAAGCGACCUCGCGAGAGCAAGCGGACCUCAUAAAGUGCGUCGUAG
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
UCCGGAUUGGAGUCUGCAACUCGACUCCAUGAAGUCGGAAUCGCUAGUAAUCGUGGAUCAGAAUGCCACGGUGAAUACGUUCCCGGGCCUUGUACACACC
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
GCCCGUCACACCAUGGGAGUGGGUUGCAAAAGAAGUAGGUAGCUUAACCUUCGGGAGGGCGCUUACCACUUUGUGAUUCAUGACUGGGGUGAAGUCGUAA
1510 1520 1530 1540
CAAGGUAACCGUAGGGGAACCUGCGGUUGGAUCACCUCCUUA

Abb.1: Die Sequenz der 16S RNA von E.coli Ribosomen (nach Brosius et al., 1978)

Abb. 2: Die Sequenz der 23S RNA von E. coli Ribosomen (nach Brosius et al., 1980)

Die Modelle (16S und 23S RNA) von Zwieb et al. und Glotz et al. werden als "Berlin"-, von Woese/Noller et al. als "California"- und von Stiegler/Branlant et al. als "Straßburg"-Modell bezeichnet. Anhand des phylogenetischen Vergleichs dieser Modelle wurden neue Sekundärstruktur-Modelle der 16S- und 23S RNA durch die "Berlin"-Gruppe (Maly und Brimacombe, 1983) entwickelt (vgl. Abb. 3 und Abb. 4). In diesen neuesten Modellen sind über 85% der Sekundärstrukturelemente eindeutig bewiesen (Brimacombe und Stiege, 1985). Neben den 16S und 23S RNA Modellen wurde eine Reihe von Sekundärstrukturen für alle RNA Moleküle der kleinen und großen ribosomalen Untereinheiten von Pro- und Eukaryonten vorgeschlagen (Übersicht bei Brimacombe, 1985). Durch einen Vergleich der ribosomalen RNA Moleküle von verschiedenen Organismen konnte man feststellen, daß die Sekundärstrukturen der Moleküle während der Evolution mehr konserviert wurden als ihre Primärstrukturen (Brimacombe et al., 1983). Die unterschiedliche Länge der RNA Moleküle von verschiedenen Organismen werden durch "Insertion" oder durch "Deletion" von bestimmten Bereichen der RNA, z.B. am Stamm oder am Loop, verursacht (Brimacombe et al., 1983). Die Deletionen und Insertionen wurden in den spezifischen Bereichen innerhalb der Sekundärstrukturen, die sich von dem konservierten Kern der Moleküle unterscheiden, gefunden (Brimacombe et al., 1983).

Es gibt zunehmend Hinweise, daß die RNA Moleküle eine Konformationsänderung erfahren können. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, daß ein bestimmter Bereich der RNA mit mehr als einem anderen Bereich des RNA-Moleküls basengepaart sein kann. Diese "Konformationsschaltungen" ("switch") weisen auf die funktionelle Bedeutu ng der RNA Moleküle in Ribosomen hin (Brimacombe und Stiege, 1985). Beim Aufbau des Ribosoms wird die Sekundärstruktur der RNA zur Tertiärstruktur weitergefaltet. Sie wird durch elektrostatische und durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den ribosomalen Proteinen assoziiert; erst dadurch wird eine komplette Ribosomen- Struktur gebildet.

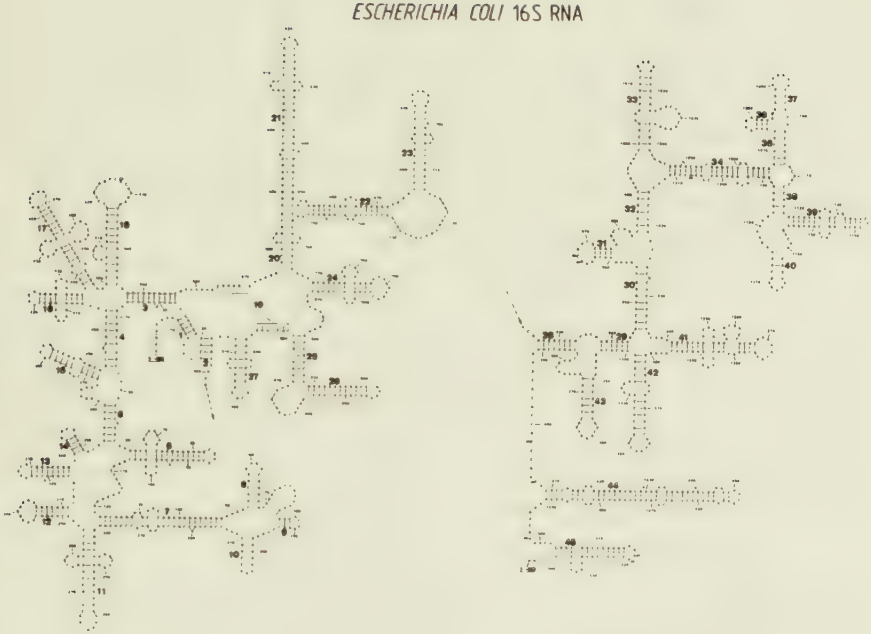


Abb. 3: 16S RNA Sekundärstruktur Modell von E. coli der "Berlin"-Gruppe (nach Maly und Brimacombe, 1983)

Abb. 4: 23S RNA Sekundärstruktur Modell von E. coli der "Berlin"-Gruppe (nach Maly und Brimacombe, 1983)

2.1.2. Ribosomale Proteine

Die 50S Untereinheit enthält 32 unterschiedliche Proteine (L1 - L34). Mit Ausnahme der Proteine L7 und L12, die sich nur durch Acetylierung des N-terminalen Endes von L7 unterscheiden (Terhorst et al., 1972), haben die Proteine keine Sequenzhomologien (Wittmann, 1976). Im 70S Ribosom kommen die Proteine alle nur in einer Kopie vor mit Ausnahme von L7/L12, die in vier Kopien vorkommen (Subramanian, 1975). Das Protein L8 ist ein Proteinkomplex: es enthält die bereits erwähnten vier Kopien der Proteine L7/L12 und eine Kopie von L10 (Pettersson et al., 1976; Pettersson und Liljas, 1979).

Die 30S Untereinheit enthält 21 verschiedene Proteine (S1 - S21). Das Protein S20 ist identisch mit dem Protein L26; dieses Protein scheint ein Bestandteil der beiden ribosomalen Untereinheiten zu sein (Stöffler, 1974; Wittmann und Wittmann-Liebold, 1974). Das Protein S1 ist das größte Protein in der 30S Untereinheit; es scheint mehrere funktionelle Rollen zu haben (Subramanian, 1983).

Die Primärsequenzen aller ribosomalen Proteine von *E. coli* sind bekannt (Wittmann-Liebold, 1982; Wittmann, 1982). Mit verschiedenen physikalischen Methoden (u.a. CD, Fluorometrie, NMR, limitierte Proteolyse, Kristallisation, Röntgenstrukturanalyse, Fluoreszenzspektroskopie und Mikrokalorimetrie) wurde versucht, die Struktur der Proteine aufzuklären. Die Gestalt der Proteine, globulär (S8, S16, L1, L25, L30) oder langgestreckt (S1, L3, L11), konnte durch Neutronen- und Röntgenkleinwinkelstreuung sowie durch hydrodynamische Methoden bestimmt werden. Sekundär- und Tertiärstruktur für die ribosomalen Proteine wurden diskutiert (Übersicht bei Wittmann, 1982 und Giri et al., 1984).

2.2. Funktion der Ribosomen

Folgende Fragen stellen sich über die Rolle der Ribosomen bei der Proteinbiosynthese:

- Wie wird das Startcodon erkannt und die Nukleotidsequenz der mRNA (Boten-RNA) zu Trinukleotiden gerastet?
- Wie wird die Peptidkette synthetisiert?
- Wie wird die mRNA als "Informationsband" um jeweils ein Trinukleotid pro gebildete Peptidbindung in ihre 3'-Ende Richtung verschoben?

Alle diese Prozesse erfordern das kooperative Zusammenwirken verschiedener Protein- und Ribonukleinsäure-Moleküle in den Ribosomen.

Die Biosynthese der Proteine läßt sich in drei Schritte gliedern (vgl. Abb. 5):

- Initiation (Kettenstart)
- Elongation (Kettenverlängerung)
- Termination (Kettenabbruch)

Jeder der Teilschritte benötigt dafür spezifische Proteine; bei Escherichia coli sind es die Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2, IF-3), die Elongationsfaktoren (EF-Tu, EF-G) und die Terminations-Faktoren oder "Releasefaktoren" (RF-1, RF-2, RF-3 und RRF).

Initiation

In der Initiationsphase erfolgt die Interaktion der beiden ribosomalen Untereinheiten mit der mRNA, den Initiationsfaktoren, der Initiations-tRNA und dem GTP. Insgesamt läßt sich der Initiationsprozess in sieben einzelne Reaktionen gliedern (Nierhaus, 1982), siehe Abb. 5, I1-I7:

Nachdem die 70S Ribosomen in ihre 30S- und 50S Untereinheiten dissoziiert sind (I2), erfolgt die Bindung des Initiationsfaktors IF-3 (durch Stimulierung des Initiationsfaktors IF-1) an die 30S Untereinheit (I3). Der nächste Schritt ist die Bindung der Shine-Dalgarno-Sequenz auf der mRNA an die 30S Untereinheit (I4). Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist eine purinreiche Sequenz, 7-15 Basen langgestreckt aufwärts vom AUG-Initiationscodon. Die Basen sind komplementär zu 3-7 Basen in einer poly-pyrimidinreichen Sequenz in der Nähe des 3'-Endes der 16S RNA.

Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Bindung der Initiations-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}) und die Erkennung des Startcodons AUG oder GUG auf der mRNA mit Hilfe des Initiationsfaktors IF-2 und des GTP, gleichzeitig werden IF-3 und IF-1 freigesetzt (I5 - I6). Der letzte Schritt in diesem Initiationsprozess ist die Anlagerung der 50S Untereinheit an den 30S Initiationskomplex unter Energieverbrauch (GTP-Hydrolyse) und Freisetzung der Initiationsfaktoren IF-2; anschließend wird der 70S Initiationskomplex (I6 - I7) gebildet. Durch die Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten entsteht die Bindestelle für die Aminoacyl-tRNA (A-Stelle). Die fMet-tRNA^{fMet} besitzt im 70S Ribosom die Peptidyl-tRNA-Bindestelle (P-Stelle).

Elongation

Im Elongationszyklus (siehe Abb. 5, E1 - E5) wird als erster Schritt eine Aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) an den 70S Initiationskomplex angelagert; dabei wird die beladene tRNA als ternärer Komplex zusammen mit dem GTP und dem Elongationsfaktor EF-Tu an die A-Stelle des Ribosoms gebunden. In diesem Stadium liegen die beiden tRNA Moleküle so auf dem Ribosom, daß die α-Aminogruppe der AA-tRNA die Esterbindung der benachbarten fMet-tRNA^{fMet} nucleophil angreifen kann. Im nächsten Schritt erfolgt die sogenannte Peptidyltransferasereaktion. Die Amino-

säure der Peptidyl-tRNA wird hydrolysiert und durch eine Peptidbindung auf die Aminoacyl-tRNA übertragen (dieser Schritt wird durch die Peptidyltransferase katalysiert). Nach der Übertragung der Aminosäure befindet sich eine desacylierte tRNA an der P-Stelle und eine Peptidyl-tRNA an der A-Stelle. Die desacylierte tRNA dissoziiert vom Ribosom, und die neue Peptidyl-tRNA wird in die P-Stelle transferiert; dieser Vorgang wird katalysiert durch den zweiten Elongationsfaktor EF-G und die gleichzeitige Hydrolyse von GTP. Die Peptidyl-tRNA wird von der A-Stelle in die P-Stelle transferiert, und ein neuer ternärer Komplex AA-tRNA-EF-Tu-GTP lagert sich an die freigewordene A-Stelle an. Dieser Zyklus läuft einmal für jede eingebaute Aminosäure ab und wird erst dann beendet, wenn ein Terminationscodon an die A-Stelle gebunden wird. Zur Zeit werden zusätzliche tRNA Bindestellen diskutiert. Sie sollen für die Erkennung der AA-tRNA sowie für die Übernahme der desacylierten tRNA verantwortlich sein (Rheinberger et al., 1981). Diese zusätzliche Codon-abhängige Bindestelle wird als E(exit)-Stelle genannt (Übersicht bei Nierhaus, 1982).

Termination

Wenn ein Terminationscodon UAA, UAG oder UGA auf der mRNA an der A-Stelle des Ribosoms angelangt ist, wird das Release-Faktor-Protein RF-1 (spezifisch für UAA oder UAG) oder das Release-Faktor-Protein RF-2 (spezifisch für UAA oder UGA) an das Ribosom gebunden. Es kommt zur Hydrolyse der Polypeptid-Peptidyl-tRNA Bindung, und die synthetisierten Polypeptide verlassen die Ribosomen. Erst durch die Bindung des Ribosoms an das Release-Faktor-Protein (RRF) wird das leere Ribosom von der mRNA abgetrennt. Beim Verlassen der Ribosomen wird dabei ein GTP Molekül hydrolysiert. Es ist aber noch nicht ganz klar, welche von den Faktoren (EF-G, RF-1, RF-2 oder RRF) diese Hydrolyse verursachen (Ogawa und Kaji, 1975). Nachdem die Release-Faktoren die Ribosomen verlassen haben, kann ein neuer Zyklus begonnen werden (Weissbach, 1980; Nierhaus, 1982). Trotz

der Erkenntnisse der Proteinbiosynthese weiß man noch wenig über die komplizierten Vorgänge auf der molekularen Ebene des Ribosoms. Für das Verständnis der Funktion des Ribosoms ist es unbedingt notwendig, seinen strukturellen Aufbau aufzuklären. Untersuchungen über die Struktur der an der Proteinbiosynthese beteiligten Bestandteile der Ribosomen wurden auf verschiedenen Ebenen gemacht (Übersicht bei Wittmann, 1983 und Giri et al., 1984):

- Untersuchungen an der ribosomalen RNA
- Untersuchungen an den ribosomalen Proteinen
- Untersuchungen über die direkte Nachbarschaftsbeziehung zwischen RNA und Protein
- Untersuchungen direkt am Ribosom (Topographie)

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung der nativen Konformation der ribosomalen RNA.

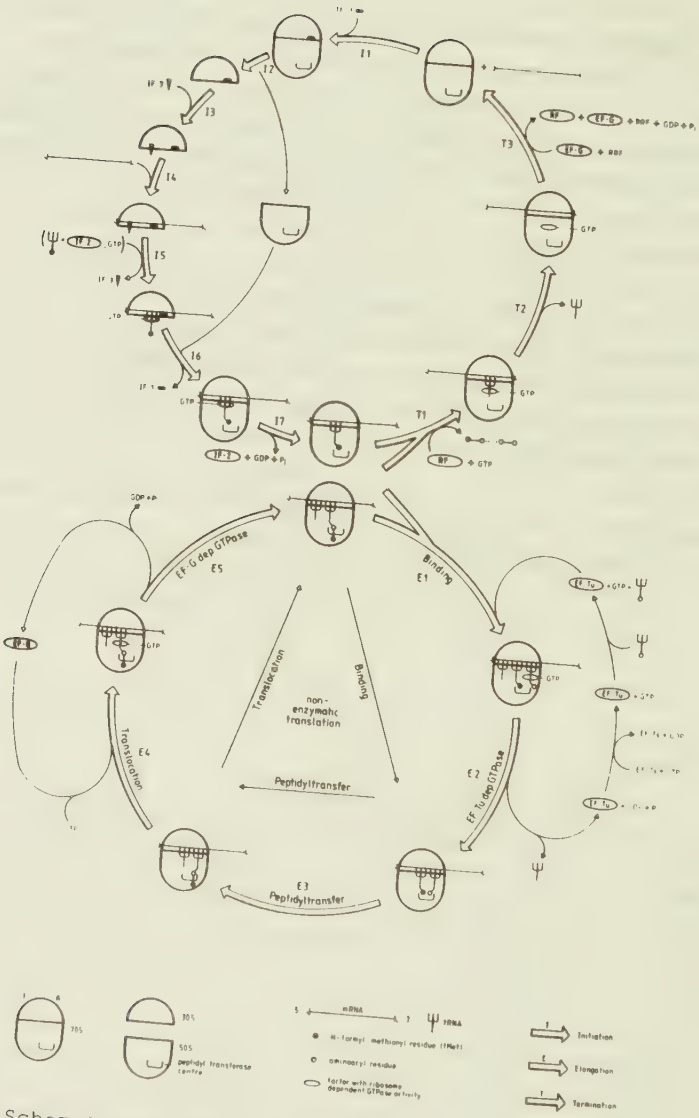


Abb. 5: Schematische Darstellung des Proteinbiosynthesezyklus (entnommen von Nierhaus, 1982)

2.3. Topographie der Ribosomen von E. coli

2.3.1. Umriß und Größe der Ribosomenbestandteile

Eine genaue Untersuchung des Umrisses und der Größe der Bestandteile von Ribosomen ist die Voraussetzung für den Aufbau ihrer dreidimensionalen Struktur. Zwei verschiedene Methoden, Elektronenmikroskopie und Röntgenkleinwinkelstreuung, wurden hauptsächlich zur Strukturuntersuchung der ribosomalen Untereinheiten angewendet. Die Untersuchungsergebnisse weisen kugelförmige Strukturen der Untereinheiten nach: die 30S Partikel haben eine Größe von etwa 55 x 220 x 220 Å und die 50S Partikel eine Größe von etwa 115 x 230 x 230 Å (Übersicht bei Wittmann, 1983; Giri et al., 1984). Während für die 50S Untereinheiten die Untersuchungsergebnisse von verschiedenen Gruppen eine gute Übereinstimmung zeigen, besteht eine Diskrepanz bei den 30S Partikeln. Trotz dieser Diskrepanz zeigen die 30S Untereinheiten gemeinsame Merkmale: sie haben eine länglich asymmetrische Form und sind unterteilt in einen kleineren "Kopf" (etwa 1/3 der Partikel) und einen größeren "Körper" (etwa 2/3). Aus dem Körper geht unterhalb des Kopfes ein Vorsprung - die sogenannte Plattform - hervor. Die 50S Modelle besitzen einen kronenförmigen Basiskörper mit drei verschiedenen Protuberanzen in verschiedenen Größen und Formen. In der Abb. 6 werden die vorgeschlagenen Modelle der ribosomalen Untereinheiten von Stöffler et al., 1983, Abb. 6A & B; Lake et al., 1980, Abb. 6C & D und Boublik 1984, Abb. 6E & F) gezeigt.

Abb. 6: Vorgeschlagene Modelle der ribosomalen Untereinheiten (30S und 50S) von Stöffler et al., Lake et al. und Boublik et al.

2.3.2. Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Ribosomen und ihrer Bestandteile

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß die 70S Ribosomen, wie in Abb. 7 zu sehen ist (hier werden 70S Ribosomen-Modelle von Stöffler et al., 1982, Abb. 7A, von Lake et al., 1979, Abb. 7B und von Boublik et al., 1982, Abb. 7C, gezeigt), eine rundliche Gestalt haben. Die 70S Ribosomen haben eine Größe von etwa 170 x 230 x 250 Å. Die 30S Untereinheiten scheinen quer auf den 50S Untereinheiten zu liegen (vgl. Abb. 7A), und zwar so, daß der Kopf der 30S Partikel nahe an der "Schulter" des Proteins L1 der 50S Partikel liegt. Die unterschiedlichen Modelle der 70S Ribosomen (vgl. Abb. 7A-C) beruhen auf der verschiedenen Orientierung der kleinen und großen Untereinheiten in den 70S Ribosomen.

Dreidimensionale Kristalle der 50S Untereinheiten aus Bacillusstearothermophilus (Yonath et al., 1982), der 70S Ribosomen aus E. coli (Wittmann et al., 1982) und der 50S Untereinheit aus Halobacterium marismortui (Shevack et al., 1985) konnten gewonnen werden. Diese Kristalle werden zur Zeit mit der Röntgenstrukturanalyse untersucht (Yonath et al., 1984).

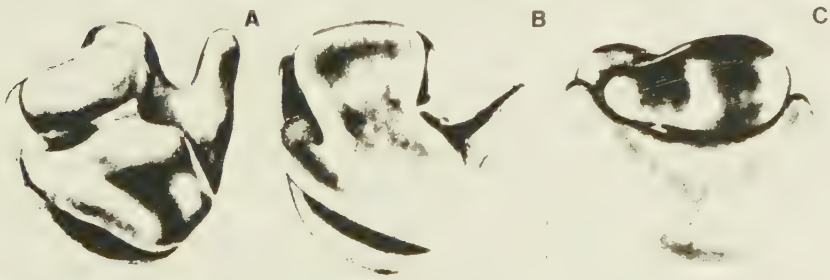


Abb. 7: 70S Ribosomen-Modelle der Stöffler (A)-, Lake (B) und Boublik (C)-Gruppe.

2.3.2.1. Untersuchungen an den ribosomalen Proteinen

Neben den oben genannten Methoden wurde eine Reihe anderer Methoden zur Aufklärung der räumlichen Anordnung der Poteine in den ribosomalen Untereinheiten verwendet. Immunelektronenmikroskopisch lassen sich Stellen auf der Ribosomenoberfläche lokalisieren, an denen sich antigene Determinanten von den betreffenden Proteinen befinden. Spezifische, gegen einzelne ribosomale Proteine gerichtete IgG-Antikörper reagieren im allgemeinen nicht nur mit ribosomalen Untereinheiten, sondern auch mit 70S Ribosomen (Stöffler et al., 1973; Zeichhardt, 1976). Wabl hat 1973 zum ersten Mal diese Technik für die Aufklärung der Ribosomenstruktur angewendet. An 70S Ribosomen gebundene Antikörper wurden von Tischendorf et al. (1975 & 1976) und Lake et al. (1976) elektronenmikroskopisch dargestellt; es sind jedoch Unterschiede zwischen beiden Modellen festzustellen.

Die Unterschiede können sowohl auf Schwierigkeiten bei der Reinigung der Antikörper als auch auf unterschiedliche EM-Präparationen zurückgeführt werden. Die Lokalisierung einer Reihe von Proteinen auf der Oberfläche der ribosomalen Untereinheiten konnte mit der IEM-Methode erzielt werden (Stöffler-Meilicke et al., 1983; Winkelman und Kahan, 1983; Breitenreuter et al., 1984). Einige funktionelle Domänen wurden ebenfalls mit dieser Methode lokalisiert : z.B. die mRNA Bindungsstelle (Lührmann et al., 1980; Stöffler und Stöffler-Meilicke, 1981) und die Decodingseite in den 30S Untereinheiten (Keren-Zur et al., 1979). Durch die Lokalisierung der Bindungsstelle der Antibiotika Chloramphenicol und Puromycin konnte das Peptidyltransferase-Zentrum identifiziert werden (Lührmann et al., 1980; Stöffler et al., 1980). Ebenso wurde die Bindungsstelle für IF-3 (Lührmann et al., 1980; Stöffler und Stöffler-Meilicke, 1981) und EF-G (Girshovich et al., 1981) mit dieser Methode untersucht. Mit Hilfe der IEM wurde die Ausgangsstelle für die gerade gebildeten (nascenten) Polypeptide identifiziert (Bernabeau und Lake, 1982). Ebenfalls mit dieser Methode

konnte die Thiostrepton-Bindungsstelle lokalisiert werden (Stöffler et al., 1980).

Eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Proteinen, die in der Nachbarschaft innerhalb der ribosomalen Untereinheit liegen, ist die Neutronenstreuung. Diese Methode ermöglicht die Messung der Abstände zwischen den ribosomalen Poteinen in situ, aus denen man den Umriß der Untereinheiten bestimmen kann (Übersicht bei Wittmann, 1983; Giri et al., 1984). Die 30S Untereinheiten werden aus den einzelnen Bestandteilen rekonstituiert, von denen zwei der zu untersuchenden Proteine deuteriert vorliegen. Von diesen deuterierten Proteinpaaren kann mit Hilfe der Neutronenstreuung der Abstand der Massenzentren bestimmt werden. Moore et al (1983) konnten anhand von 59 Datenpaaren von Neutronenstreuungsabständen 14 verschiedene Proteine in den 30S Untereinheiten lokalisieren, deren Lage mit den Ergebnissen der IEM übereinstimmt (vgl. Abb. 8). Ein paar Jahre später konnten diese Autoren anhand von 80 Datenpaaren die Lokalisierung von 19 Proteinen (alle außer S1 und S21) der kleineren ribosomalen Untereinheit zeigen (Ribosome Conference, Texas, 1985).
In der 50S Untereinheit benutzt man die "umgekehrte" Methode; hier werden alle Proteine deuteriert bis auf die zwei zu untersuchenden Proteine, deren Abstand nach der Rekonstitution gemessen wird. Auf diese Weise konnte die Lage von fünfzehn verschiedenen Proteinen bestimmt werden (Nierhaus et al., 1985).

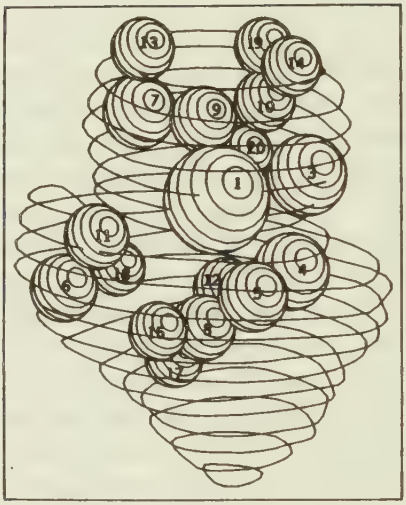


Abb. 8: Proteinanordnung in den 30S Untereinheiten, ermittelt durch Neutronenstreuungsstudien (übernommen von P. Moore, 1985)

Mit Hilfe des Förster-Energieübertragungsmechanismus (singlet-singlet energy transfer) wird versucht, die Abstände zwischen zwei Proteinen bzw. zwischen Protein und RNA, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert wurden, zu bestimmen (Übersichtsartikel bei Wittmann, 1983).

Die Quervernetzungsreaktion gehört zu einer der wichtigsten Methoden zur Untersuchung der Topographie von ribosomalen Proteinen. Die Nachbarschaft der Proteine innerhalb der Ribosomen kann durch Vernetzungsreaktionen ermittelt werden; als Quervernetzungsreagenz werden dafür bifunktionelle Reagenzien benutzt. Eine Reihe von Proteinquervernetzungen innerhalb der 30S und 50S Untereinheiten konnte von verschiedenen Gruppen nachgewiesen werden (Übersicht bei Wittmann, 1983; Giri et al., 1984). Die Quervernetzungsergebnisse zeigen teilweise eine gute Übereinstimmung bei der Anordnung der Proteine in-

nerhalb der Ribosomen mit anderen Studien (z.B. mit der Immun-Elektronenmikroskopie oder der Neutronenstreuung). Bifunktionelle Reagenzien eignen sich ebenfalls gut als Quervernetzungsreagenzien zur Identifizierung der Proteine auf der Grenzfläche ("Interface") zwischen den ribosomalen Untereinheiten 30S und 50S in den 70S Ribosomen (Lambert und Traut, 1981; Cover et al., 1981). Seitdem alle Aminosäuresequenzen der ribosomalen Proteine von E. coli bekannt sind (Wittmann, 1982), ist es möglich, die vernetzten Aminosäuren der Proteine genau zu identifizieren. Dies gelang Allen et al., 1979 für die Proteine S5 x S8 und Maasen et al., 1981, für die Proteine L7 x L12.

Mehrere Methoden und viele verschiedene Reagenzien wurden für die RNA-Protein Vernetzungen verwandt (Übersicht Wittmann, 1983; Giri et al., 1984). Bei der Quervernetzungsreaktion mit den bifunktionellen Reagenzien erwies sich die Analyse der Vernetzungsstelle als schwierig, da das Protein mit verschiedenen Stellen der RNA vernetzt wurde (Brimacombe et al., 1985). Für die Aufklärung der Topographie der Ribosomen werden die Daten der RNA-Protein Quervernetzung erst nutzbar, wenn die Vernetzungsstelle insbesondere auf der RNA genau zu identifizieren ist. Dies wurde bereits für die Proteine S7, S8, S17 und S21 in den 30S Untereinheiten und für die Proteine L1, L4, L6, L21, L23, L27 und L29 in den 50S Untereinheiten erreicht (Übersicht bei Brimacombe, 1985; vgl. auch Abb. 9). Für die Vernetzungen von S7 und L4 konnte die genaue Vernetzungsstelle sowohl auf der RNA- als auch auf der Proteinseite lokalisiert werden (Übersicht bei Brimacombe et al., 1983).

Die Zugänglichkeit der Proteine und der spezifischen RNA-Bereiche, die auf der Oberfläche der ribosomalen Untereinheiten liegen, wurde mit verschiedenen Protein- bzw. RNA-spezifischen Reagenzien und Enzymen (Proteasen bzw. RNasen) sowie mit Antikörpern untersucht (Übersicht bei Wittmann, 1983; Giri et al., 1984). Durch Jodinierungsexperimente wurde Nachbarschaften zwischen den Proteinen gefunden (Changchien und Cra-

ven, 1979). Die genaue Lokalisierung der Proteine auf der Oberfläche der ribosomalen Untereinheiten können aber erst durch Jodinierung der Tyrosinreste mit immobilisierter Laktoperoxidase (Wower et al., 1983; Maly et al., 1983) erreicht werden. Mit den einzel- und doppelsträngigen RNasen wurde ebenfalls die Zugänglichkeit der RNA-Bereiche erfolgreich untersucht (Stiegler et al., 1981; Branlant et al., 1981). Das Reagenz Kethoxal, das spezifisch mit der Base Guanosin der RNA reagiert, wurde von Noller (1974) für die Untersuchung in intakten 30S ribosomalen Untereinheiten verwendet. Etwa zwei Dutzend Guanosine sind dadurch modifiziert worden; sie konnten hauptsächlich im mittleren Teil bis zum 3'-Ende des 16S RNA Moleküls identifiziert werden.

Eine der wichtigsten Erkenntnisse bei der Untersuchung der Topographie der Ribosomen ist die Möglichkeit, die isolierten ribosomalen Bestandteile in vitro zu rekonstituieren und dabei wieder funktionelle ribosomale Untereinheiten zu bilden. Nomura und Traub (1968) konnten dies anhand ihrer Experimente mit 30S Untereinheiten zeigen. Die Resultate dieser Rekonstitutionsexperimente zeigen eine gute Übereinstimmung der Proteinanordnung mit denen von IEM, Quervernetzungsreaktion und Neutronenstreuung. Ein paar Jahre später gelang Nierhaus und Dohme (1974) die Rekonstitution der aktiven 50S Untereinheiten von E. coli.

2.3.2.2. Untersuchungen an der ribosomalen RNA

Die oben erwähnten Untersuchungen beziehen sich im wesentlichen auf die Lage der ribosomalen Proteine. Da aber zwei Drittel der Masse der Ribosomen aus RNA besteht, so ist es wichtig, auch die RNA-Konformation aufzuklären. Es gibt außerdem Hinweise, daß die RNA eine wichtige Rolle bei Funktion und Strukturbildung der Ribosomen spielt (Brimacombe und Stiege, 1985). Shine und Dalgarno haben im Jahre 1974 die These aufgestellt, daß sich die RNA durch die Bindung der 16S RNA an die

mRNA in der Initiationsphase an der Ribosomenfunktion beteiligt. Dieses wurde von Steitz und Jakes später experimentell bestätigt (Übersicht Steitz, 1980). Ein weiteres Beispiel der Funktionsbeteiligung der RNA konnte durch Experimente von Noller und Chaires (1972) aufgezeigt werden. Sie konnten dabei nachweisen, daß die mit Kethoxal modifizierte 16S RNA in den 30S Untereinheiten die Fähigkeit verliert, die tRNA Moleküle zu binden. Eine mögliche Beteiligung der 23S RNA als Bindestelle im Peptidyltransferase-Zentrum wurde ebenso diskutiert (Dahlberg et al., 1977).

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an isolierten RNA Molekülen der 5S RNA (Tesche et al., 1980; Sieber et al., 1980), der 16S RNA (Vasiliev et al., 1978; Sieber et al., 1980; Edlind und Bassel, 1980; Boublik et al., 1982) und der 23S RNA (Sieber et al., 1980; Edlind und Bassel, 1980; Vasiliev und Zalite, 1980; Boublik et al., 1982) konnte man zeigen, daß die RNA Moleküle eine kompakte Struktur aufweisen. Nach der Aufklärung der Primärsequenzen der beiden großen ribosomalen Ribonukleinsäuren von E. coli war es möglich, die Sekundärstruktur dieser und anderer Moleküle mit verschiedenen Methoden darzustellen (Übersicht bei Brimacombe, 1985).

Die Sekundärstrukturmodelle der RNA Moleküle bieten eine gute Grundlage für die Aufklärung ihrer detaillierten Tertiärstruktur und deren Wechselwirkung mit den anderen ribosomalen Bestandteilen. Es stellt sich die Frage, wie diese Sekundärstruktur innerhalb der Untereinheiten in die Tertiärstruktur gefaltet wird. Verschiedene Methoden wurden für die Aufklärung der räumlichen Anordnung der 16S und 23S RNA in den Ribosomen angewandt. Mit Hilfe der IEM-Methode konnen einige charakteristische RNA Bereiche innerhalb der 30S Untereinheiten lokalisiert werden: das 5'-Ende der 16S RNA (Mochalova et al., 1982), das Nukleotid N^7-Methylguanosin in der Position 527 (Trempe et al., 1982), die Nukleotide N^6-Methyladenosin in den Positionen 1518 und 1519 (Politz und Glitz, 1977; Stöffler und Stöffler-Meilicke, 1981) und das 3'-Ende der 16S

RNA (McKuskie-Olson und Glitz, 1979; Shatsky et al., 1979; Lührmann et al., 1981). Ein hochmodifiziertes Nukleotid (5-Carboxylmethoxyuridin) des tRNA Moleküls, das mit dem Nukleotid Cytosin (in der Position 1400 der 16S RNA) quervernetzt wurde, konnte durch die IEM in einem Bereich der 30S Untereinheiten lokalisiert werden (Gornicki et al., 1984) (vgl. Abb. 9). Das modifizierte 5'-und 3'-Ende der Poly-U konnte in demselben Bereich lokalisiert werden; dieses Ergebnis ist von besonderer Wichtigkeit, denn es läßt die Deutung zu, daß die Boten-RNA (mRNA) Moleküle eine Windung in eine U-Form durch die Ribosomen erfahren (Evstafieva et al., 1983).

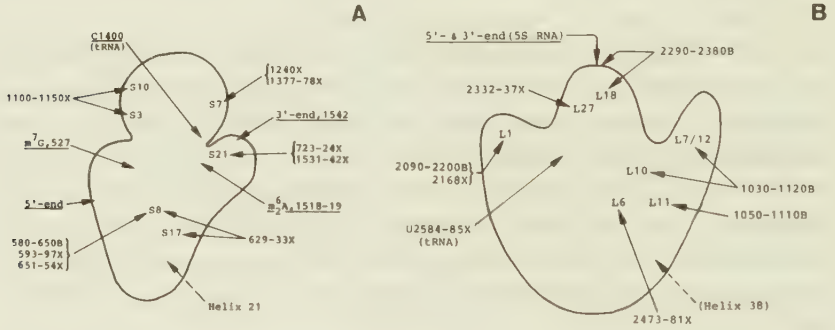


Abb. 9: Lokalisierung von rRNA-Regionen der 30S(A) und 50S(B) Untereinheit, die durch IEM ermittelt wurden. Die RNA-Protein-Vernetzungsstellen sind hier ebenfalls dargestellt (vgl. Text; nach Brimacombe et al., 1983; Brimacombe, 1985).

Das 5'-Ende der 5S RNA wurde ebenfalls mit der IEM-Methode von Stöffler-Meilicke (1981) identifiziert. Mit derselben Methode konnte das 3'-Ende sowohl von der 5S- als auch von der 23S RNA lokalisiert werden (Shatsky et al., 1980). Das 5'-Ende der 5S RNA wurde in den *E. coli* Mutanten, deren RNase III fehlte, elektronenmikroskopisch von Clark und Lake (1984) identifiziert. Die Lokalisierung dieser spezifischen RNA Bereiche ist

sehr wertvoll, da sie als Bezugspunkte für die Untersuchung der räumlichen Anordnung der RNA Moleküle im Ribosomenpartikel dienen können.

Ein direkterer Weg zur Aufklärung der RNA-Tertiärstruktur ist die intramolekulare Quervernetzung der RNA in den nativen Ribosomen. Es sollte daher möglich sein, durch diese Methode Quervernetzungen von RNA-Bereichen, die in der Primär- und Sekundärstruktur weit voneinander entfernt, in nativer Konformation aber benachbart liegen, zu erzielen und dadurch eine direkte Auskunft über die Tertiärstruktur der RNA zu erhalten. Über Quervernetzungen der Nukleinsäure mit Lost-Derivaten wurde erstmals 1961 (Brookes und Lawley) berichtet. Das Reagenz Bis-(2-chlorethyl)-sulfid/S-Lost wurde von Malbon und Parish (1971) für die RNA-Quervernetzungsreaktion angewandt. Durch Behandlung der 50S Untereinheiten mit dem Reagenz Bis-(2-chlorethyl)-methylamin/N-Lost konnten mehrere Tertiärstruktur-Vernetzungen, die in der Primär- und in der Sekundärstruktur weit entfernt liegende RNA-Bereiche miteinander verknüpfen, innerhalb der 23S und 5S RNA identifiziert werden (Stiege et al., 1982). Eine Serie von tertiären Quervernetzungen innerhalb der 23S RNA konnte auch durch ultraviolette Bestrahlung der 50S ribosomalen Untereinheiten erzielt werden (Stiege et al., 1983). Die Topographie der Grenzfläche zwischen den beiden ribosomalen Untereinheiten läßt sich durch RNA-RNA Quervernetzungen mit N-Lost als Reagenz (Zwieb et al., 1978) untersuchen; allerdings ist die Analyse der Quervernetzungsstellen nicht einfach, da die Verkleinerung der Fragmente durch partielle Hydrolyse mit RNase V_1 nach der Quervernetzungsreaktion an der 16S und 23S RNA mit fast 4500 Nukleotiden durchgeführt werden muß. RNA-Vernetzungen konnten ebenfalls durch Vernetzungsreaktionen mit Psoralen-Derivaten als Reagenz erreicht werden (u.a. Thammana et al., 1979). Allerdings tragen diese Vernetzungen, sowie die tertiären Vernetzung innerhalb der 16S RNA, die durch eine Reaktion mit Glyoxal-Derivaten als Reagenz (u.a. Expert-Bezancon et al., 1983) erzielt wurden, wenig zur Aufklärung der räumlichen

Anordnung der RNA Moleküle bei, da sie mit isolierten-RNA Molekülen gemacht wurden.

Im Gegensatz dazu leisteten die bereits erzielten tertiären Quervernetzungen innerhalb der nativen 50S ribosomalen Untereinheiten (Stiege et al., 1982 & 1983) einen Beitrag für die dreidimensionale Organisation der 23S RNA. Es war daher die Aufgabe dieser Arbeit,

-RNA-RNA Quervernetzungen innerhalb der 16S RNA durch milde ultraviolette Bestrahlung der 30S Untereinheiten zu induzieren und die Vernetzungstellen zu identifizieren,

- durch Behandlung der 30S Untereinheiten mit N-Lost die RNA-RNA Quervernetzungen innerhalb der 16S RNA zu lokalisieren,

- durch Behandlung der 70S Ribosomen mit N-Lost RNA-RNA Quervernetzungen zwischen 16S und 23S RNA zu induzieren und anhand der Quervernetzungsergebnisse die Topographie der Grenzfläche zwischen den beiden ribosomalen Untereinheiten aufzuklären und

- dreidimensionale Modelle, abgeleitet von bereits gebauten Sekundärstruktur-Modellen der 16S und 23S RNA Moleküle, aufzubauen, damit die erhaltenen RNA-RNA Quervernetzungsergebnisse richtig ausgewertet werden können.

Für die Analyse der Vernetzungen der ribosomalen RNA werden zunächst Ribosomen und ribosomale Untereinheiten benötigt, deren RNA gleichmäßig mit ^{32}P markiert ist. Mit diesen wird die Quervernetzungsreaktion durchgeführt, entweder durch UV-Bestrahlung oder durch chemische Reagenzien. Danach wird die RNA in den Ribosomen bzw. in den Untereinheiten mit RNasen partiell hydrolysiert. Die daraus entstehenden Fragmente werden in einem zweidimensionalen Gelelektrophoresesystem getrennt; die vernetzten Fragmente erscheinen dann auf dem 2D-Gel als Flecken oberhalb der Diagonale. Nach der Autoradiographie werden sie aus dem 2D-Gel extrahiert, isoliert, in einem Fingerprint-System nach Volkaert und Fiers (1977) sequenziert und analysiert.

3. MATERIALIEN UND GERÄTE

3.1. Materialien

3.1.1. Bakterienstamm

E. coli MRE 600	Dr. K. Isono, Max-Planck-Institut Berlin

3.1.2. Proteine (Enzyme)

DNase I (E.C. 3.1.4.5.)	Sigma, USA
Proteinase K (E.C. 3.4.23.6.) (Pilze)	Merck, Darmstadt
RNase T_1 (E.C. 3.1.27.3.) (*Aspergillus oryzae*)	Sankyo, Japan
RNase T_2 (E.C. 3.1.27.1.)	Sankyo, Japan
RNase A (E.C. 3.1.4.22.) (Rinderpankreas)	Sigma, USA
RNase V_1	Prof. Dr. V.A. Erdmann, Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin

3.1.3. Transfer RNA

tRNA *E. coli* MRE 600	Boehringer, Mannheim

3.1.4. Radiochemikalien (Isotopen)

^{32}P-Orthophosphat/PBS 111	Amersham Buchler, Braunschweig

3.1.5. Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cacodylsäure (Dimethylarsensäure)	Sigma, USA
DMAPN (3-Dimethylamino-propionitril)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethylendinitrilotetra-essigsäure)	Merck,Darmstadt
Harnstoff ("Ultrapure")	Bethesda Research Laboratories, USA
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Saccharose ("Ultrapure")	Bethesda Research Laboratories, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Stickstoff-Lost/N-Lost: N-bis(2-chlorethyl)-methyl-amin-Hydrochlorid	EGA-Chemie, Steinheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)	Bio Rad Laboratories, USA
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt

Alle verwendeten Standardchemikalien waren von Merck, Darmstadt; sie hatten die Qualitätsstufe pro analysi (p.a.).

3.1.6. Oligodesoxyribonukleotide

d-(CTTCCC)	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig

Die Oligodesoxyribonukleotide waren ein Geschenk von Dr. H. Blöcker und Dr. R. Frank.

3.1.7. Verschiedenes

Entwickler Agfa 150	Agfa, Leverkusen
Fixierer Agfa 334	Agfa, Leverkusen
Frapan Polyethylenfolie	Kraft GmbH, Lindenberg
PEI-Cellulose Platten (Polygramm CEL 300 PEI)	Macherey & Nagel, Düren
Röntgenfilme Fuji X-Ray Film Medical	Fuji Photo Film, Japan
Röntgenfilme XAR-5	Kodak, USA
Verstärkerfolien (Kodak X-Omatic, Regular)	Eastman Kodak, USA
Vaseline	Fluka AG, Buchs
Zinser Szintillationsröhrchen	Zinser, Frankfurt a.M.

3.2. Geräte

Es wurden handelsübliche Geräte wie Wasser- und Schüttelbäder und Tischzentrifugen benutzt.
Die Netzgeräte und Elektrophoresepuffergefäße stammten aus den Werkstätten des Instituts.

pH-Meter	PHM 62 Standard pH Meter, Radiometer, Copenhagen
Spektralphotometer	Carl Zeiss MQ 3
Szintillationszähler	United Technologies, Packard USA
UV-Lampe	Sylvana G8T5 (USA)
Zentrifugen	Beckman Ultra-zentrifugen

4. METHODEN

4.1. Allgemeine Methoden

4.1.1. Reinigen von Glasgeräten und Puffern

Um eine Ribonukleasekontamination auszuschließen, wurden alle Glasgeräte mit Chromschwefelsäure behandelt, gewaschen und mit phosphatfreien RBS-Detergentien (Roth, Karlsruhe) nachbehandelt; anschließend wurden sie auf 160°C erhitzt. Die Glasplatten für die Gelelektrophorese wurden für 120 Minuten bei 160°C im Trockenschrank sterilisiert. Die Stammlösungen zur Herstellung der einzelnen Puffersysteme wurden autoklaviert.

4.1.2. Radioaktivitätsmessungen

^{32}P markiertes radioaktives Material kann aufgrund der hochenergetischen ß-Strahlung dieses Isotops durch eine Messung der Bremsstrahlung (v. Cerenkov Strahlung) direkt gezählt werden. Dazu wurden die Proben in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf-Gefäß) gegeben und in einem Szintillationsgefäß im breiten Tritiumkanal gezählt. Die Messungen wurden in einem Szintillationszähler gemacht. Der Maschinenblindwert betrug 20 ± 10 cpm.

4.1.3. Autoradiographie

Der Nachweis von ^{32}P-markiertem RNA-Material in den Gelen und Dünnschichtplatten, die vorher mit Parafilm- oder Polyethylenfolie geschützt worden waren, erfolgte durch Auflegen von Röntgenfilmen (Fuji X-Ray Film Medical). Für Fingerprints (vgl. 4.8.1.) mit schwacher Radioaktivität (unter 3000 cpm) und Sekundäranalysen (vgl. 4.8.2.) wurden die empfindlicheren Röntgenfilme (Kodak XAR-5) mit einer Verstärkerfolie (Kodak

X-Omatic, Regular) benutzt; sie wurden bei -80°C je nach Stärke maximal 2 Wochen exponiert. Mit diesen empfindlicheren Röntgenfilmen konnte man die Autoradiographiezeit wesentlich verkürzen; so dauerte z.B. die Autoradiographie der Fingerprints einen Tag statt wie bislang etwa 4 Tage. Die Röntgenfilme wurden anschließend in den Lösungen Agfa 150 und Agfa 334 entwickelt und fixiert.

4.2. Präparation von ^{32}P markierten Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten

Die Präparation der ^{32}P markierten Ribosomen und 30S ribosomalen Untereinheiten wurde nach der Schnellmethode von Stiege et al., 1982, durchgeführt. Das Wachstum von E. coli Bakterienzellen des Stamms MRE 600 erfolgte im Medium

0,3 mM Calciumchlorid
30 mM Magnesiumsulfat
19 mM Ammoniumchlorid
20 mM Tris-HCl pH 7,8
3 % (v/v) Glyzerin
0,2 % (w/v) vitaminfreie Casaminosäuren (Difco, USA).

Es wurde über Nacht bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. 1 ml der Übernacht-Kultur wurde in 25 ml frisches Hauptkulturmedium in Gegenwart von ^{32}P-Orthophosphat/PBS 111 (20 mCi) gegeben und bei 37°C weitergezüchtet. Das Wachstum wurde anhand des ^{32}P-Einbaus in den Zellen verfolgt (Abnahme der Radioaktivität im Wachstumsmedium). Nach 70 - 80% Einbaurate (2 1/2 bis 3 Stunden) wurden die Zellen in Eis abgekühlt und die markierten Zellen im Sorvall HB-4 Ausschwingrotor (10 Minuten; 10.000 rpm; 4°C) abzentrifugiert. Dann wurde mit 10 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM Magnesiumacetat gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 3 ml des gleichen Puffers suspendiert und anschließend mit Hilfe von Ultra-

schall unter H_2O-Eiskühlung sechsmal 1/2 Minute mit jeweils 1 Minute Pause (Stellung 2,5) aufgeschlossen. Nach dem Aufschluß wurden 2 µl DNase I (1 mg/ml) in die Suspension gegeben und die Zelltrümmer im Sorvall HB-4-Ausschwingrotor (30 Minuten; 10.000 rpm, 4°C) abzentrifugiert. Die Ribosomen aus dem Überstand wurden entweder als 70S Ribosomen (für die Vernetzung der 16S und 23S RNA vgl. 4.4.1.1.) oder als ribosomale Untereinheiten (vgl. 4.4.1.2. und 4.4.2.) isoliert.

4.2.1. Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Isolierung von 70S Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten (30S und 50S) wurden Dichtegradienten-Zentrifugationen durchgeführt.

4.2.2. Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung der 70S Ribosomen und ihrer Untereinheiten

Die 70S Ribosomen wurden durch einen 10 - 40%igen (w/v) Saccharosegradienten in einem modifizierten Puffer (Rheinberger at al., 1980)

10 mM Triethanolamin/HCl pH 7,8
6 mM Magnesiumacetat
30 mM Kaliumchlorid
6 mM 2-Mercaptoethanol

isoliert.

Die Isolierung der ribosomalen Untereinheiten erfolgte durch eine Trennung der 70S Ribosomen in einem linearen 10 - 40%igen (w/v) Saccharosegradienten in dem Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7,8
0,3 mM Magnesiumacetat

50 mM Kaliumchlorid
6 mM 2-Mercaptoethanol

In beiden Fällen wurde die Zentrifugation bei 4°C und 18.000 rpm für 17 Stunden in einem Ausschwingrotor (Beckman SW 25.2 Rotor) durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurde der Gradient in 2 ml-Portionen fraktioniert und die Radioaktivität von 4 µl-Aliquots gemessen. Die 70S-, 50S- und 30S-Fraktionen wurden getrennt gesammelt. Es wurde anschließend eine Ethanolfällung durch Zugabe von 2 mM Magnesiumacetat von 2 Volumina Ethanol 1 Stunde bei -40°C durchgeführt.

4.2.3. Dichtegradienten-Zentrifugation zur Trennung der quervernetzten 70S Ribosomen

In Anlehnung an die Methoden von Zwieb und Brimacombe (1978) wurde die Quervernetzungsreaktion mit Bis-(2-chlorethyl)-methylamin/N-Lost als Reagenz an der Grenzfläche der ribosomalen Untereinheiten ("Interface") in 70S Ribosomen durchgeführt. Nach der "Interface"-Quervernetzungsreaktion in 70S Ribosomen (vgl. 4.4.1.1.) wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation zur Trennung des quervernetzten 16S-23S RNA-Komplexes durchgeführt. Die Trennung erfolgte durch einen linearen 10 - 40%igen (w/v) Saccharosegradienten in einem ähnlichen Puffer wie bei der Isolierung der ribosomalen Untereinheiten (siehe 4.2.2.); statt Tris-HCl wurde Triethanolamin/HCl Lösung (pH 7.8) verwendet. Die Zentrifugation wurde bei 4°C und 22.000 rpm für 17 Stunden in einem Ausschwingrotor (Beckman SW 27.1 Rotor) durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurde der Gradient in 0,5 ml-Portionen fraktioniert, die Radioaktivität von 4 µl-Aliquots gemessen und die 70S-, 50S- und 30S-Fraktionen gesammelt. Die Aliquots von den gesammelten Fraktionen wurden auf einem 2 1/2 - 7 1/2% Polyacrylamid/SDS-Gradientengel analysiert (vgl. 4.6.1.3.).

4.3. Dialyseschritte zur Vorbereitung der Vernetzungsreaktionen

4.3.1. Dialyse vor der Quervernetzungsreaktion der 70S Ribosomen mit N-Lost

Nach der Ethanolfällung und anschließender Zentrifugation (vgl. 4.2.2.) wurde das 70S-Sediment in 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM Magnesiumacetat aufgenommen und 4 Stunden bei 4°C gegen den Puffer

25 mM Cacodylsäure pH 7,2
15 mM Magnesiumchlorid
50 mM Kaliumchlorid
6 mM 2-Mercaptoethanol

dialysiert und nach einem Wechsel erneut gegen den gleichen Puffer über Nacht bei 4°C weiterdialysiert.

4.3.2. Dialyse vor der Quervernetzungsreaktion der 30S ribosomalen Untereinheiten mit N-Lost

Bei der Quervernetzungsreaktion der 30S ribosomalen Untereinheiten mit N-Lost als Reagenz wurde nach der Ethanolfällung das 30S-Sediment in 1 ml Aktivierungspuffer

20 mM Triethanolamin-HCl pH 7,8
20 mM Magnesiumchlorid
6 mM 2-Mercaptoethanol
0,4 M Ammoniumchlorid

aufgenommen und bei 4°C 1 Stunde gegen den gleichen Puffer dialysiert. Eine Aktivierung erfolgte durch 10minütige Inkubation bei 37°C. Nach der Aktivierung wurde 3 - 4 Stunden bei 4°C gegen den Untereinheit-Puffer

25 mM Triethanolamin-HCl pH 7,8
5 mM Magnesiumchlorid
50 mM Kaliumchlorid
6 mM 2-Mercaptoethanol

dialyisert. Anschließend wurde gegen den Cacodylsäure-Puffer pH 7,2 (siehe 4.3.1.) über Nacht bei 4°C weiterdialysiert.

4.3.3. Dialyse vor der Quervernetzung durch ultraviolette Bestrahlung

Nach der Ethanolfällung wurde das 30S-Semiment in 1 ml Untereinheit-Puffer (siehe 4.3.2.) aufgenommen und bei 4°C 1 - 2 Stunden gegen Aktivierungspuffer (siehe 4.3.2.) dialysiert. Die Aktivierung erfolgte durch 10minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde gegen den Untereinheit-Puffer 4 Stunden bei 4°C dialysiert und nach einem Pufferwechsel über Nacht gegen den gleichen Puffer weiterdialysiert.

Nach der Dialyse wurde jeweils die Radioaktivität gemessen und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Danach wurden die dialysierten Präparationen auf die Unversehrtheit der ribosomalen RNAs in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (vgl. 4.6.2.1.) getestet.

In einer typischen Präparation wurden von den

70S	Ribosomen	11 A_{260} (6,0 - 6,8 x 10^9 cpm)
50S	ribosomalen Untereinheiten	6 A_{260} (4,0 - 4,5 x 10^9 cpm)
30S	ribosomalen Untereinheiten	4 A_{260} (1,6 - 2,0 x 10^9 cpm)

erhalten.

4.4. Vernetzungsreaktionen

Innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten wurden Vernetzungsreaktionen mit

a) ultravioletter Bestrahlung und

b) Stickstoff-Lost/N-Lost: N-bis-(2-chloroethyl)methylamin-Hydrochlorid CH_3-N(CH_2-CH_2-Cl)$_2$ (Brückenlänge 5Å) untersucht.

Für die Vernetzungsreaktion innerhalb der 70S Ribosomen ("Interface") wurde ebenfalls das Reagenz N-Lost verwendet.

4.4.1. Durchführung der Quervernetzungsreaktion mit N-Lost

Die Reaktionen mit N-Lost wurden bei 37°C für 60 Minuten durchgeführt; sie wurden durch Zugabe von doppelter Molmenge an Cysteaminchlorid gestoppt. Dabei wurden die Lösungen 15 Minuten bei 37°C weiterinkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolfällung mit 2 Volumina Ethanol 1 Stunde bei -40°C.

4.4.1.1. Vernetzungsreaktion mit N-Lost als Reagenz in 70S Ribosomen ("Interface"-Quervernetzungsreaktion)

Die Vernetzungsreaktion in 70S Ribosomen wurde nach der Methode von Zwieb und Brimacombe (1978) so durchgeführt, daß die Endkonzentration in den Reaktionslösungen 3 mM betrug. Das 70S-Sediment wurde nach der Ethanolfällung (siehe 4.4.1.) im Puffer

10 mM Triethanolamin-HCl pH 7,8
0,3 mM Magnesiumacetat
50 mM Kaliumchlorid
6 mM 2-Mercaptoethanol

aufgenommen, und für die anschließende Trennung der quervernetzten 70S Ribosomen wurde eine Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (vgl. 4.2.3.) vorbereitet.

4.4.1.2. Vernetzungsreaktion mit N-Lost als Reagenz innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten

Die Zugabe der Reagenzien für die Vernetzungsreaktion innerhalb der ribosomalen Untereinheiten erfolgte so, daß die Endkonzentration in den Reaktionslösungen 1 mM betrug.
Das 30S-Sediment wurde nach Ethanolfällung in 400 µl

10 mM Tris-HCl pH 7,8
10 mM Magnesiumchlorid
0,3 M Kaliumchlorid

aufgenommen und für den nächsten Reaktionsschritt, eine partielle Hydrolyse mit RNase V_1 (vgl. 4.5.1.), vorbereitet.

4.4.2. Vernetzungsreaktion durch ultraviolette Bestrahlung der 30S ribosomalen Untereinheiten

Die Vernetzungsreaktion der 30S ribosomalen Untereinheiten durch ultraviolette Bestrahlung wurde nach der Methode von Stiege (Dissertationsarbeit, 1984) durchgeführt.
Die 30S ribosomalen Untereinheiten wurden im "Vernetzungspuffer" (Untereinheit-Puffer, siehe 4.3.2.) in einer Konzentration bis maximal 5 A_{260}/ml bestrahlt. Die Lösungen wurden in einer Petrischale (Ø = 3,5 cm; Flüssigkeitshöhe 1 mm) unter Eiskühlung 6 Minuten mit Sylvana G8T5 UV-Lampen im Abstand von 7 cm bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die ribosomalen Untereinheiten für den nächsten Reaktionsschritt, eine partielle Hydrolyse mit RNase V_1, vorbereitet (vgl. 4.5.1.).

4.4.3. Vernetzungsreaktion durch in vivo UV-Bestrahlung der 30S ribosomalen Untereinheiten

Bei der in vivo UV-Vernetzung wurde das Wachstum der ^{32}P-markierten E. coli Zellen (nach ca. 80% Einbaurate) durch Eiskühlung gestoppt. Die anschließend abzentrifugierten, gesammelten und gewaschenen Zellen wurden in 2 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM Magnesium gelöst und direkt unter Eiskühlung bestrahlt (vgl. 4.4.2.). Nach der Bestrahlung wurden sie mit Hilfe von

Ultraschall, wie in 4.2. beschrieben, aufgeschlossen. Die anschließende Isolierung der UV-bestrahlten ribosomalen Untereinheiten erfolgte in 10 - 40% Saccharosegradienten-Zentrifugation (vgl. 4.2.2.). Danach erfolgte die partielle Hydrolyse der RNA in den 30S Untereinheiten mit RNase V_1 (vgl. 4.5.1.).

4.5. Enzymhydrolyse

Zur Analyse der Vernetzungsstelle wurden die RNA-Moleküle in den 70S Ribosomen und in den 30S ribosomalen Untereinheiten mit verschiedenen Ribonukleasen partiell hydrolysiert.

4.5.1. Partielle RNA-Hydrolyse innerhalb der ribosomalen Untereinheiten mit RNase V_1

Die doppelstrangspezifische Ribonuklease V_1 (Vassilenko und Ryte, 1975) aus dem Gift der Cobra-Schlange Naja naja oxiana wurde für die partielle Hydrolyse unter milden Bedingungen innerhalb der ribosomalen Untereinheiten benutzt.

I) Die durch N-Lost vernetzten 30S Untereinheiten (vgl. 4.4.1.2.) wurden 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden 2 µl einer 1:100 verdünnten RNase V_1 -Lösung (in 10 mM Tris-HCl, pH 7.8) zugesetzt, dann wurde 60 Minuten bei 37°C weiterinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA in einer Konzentration von 40 mM gestoppt. Danach erfolgte wiederum eine Ethanolfällung.

II) Nach der Quervernetzung der ribosomalen Untereinheiten durch ultraviolette Bestrahlung (4.4.2.) wurde die Lösung der UV-vernetzten Untereinheiten direkt ohne Ethanolfällung auf eine Endkonzentration von 10 mM Magnesiumchlorid und 300 mM Kaliumchlorid gebracht, 5 Minuten bei 37°C

vorinkubiert und mit RNase V_1 hydrolysiert (siehe I).

4.5.2. Proteinhydrolyse

Die Proteine der mit RNase V_1 partiell hydrolysierten ribosomalen Untereinheiten (vgl. 4.5.1.) nach der Quervernetzungsreaktion wurden vor der Elektrophorese mit Proteinase K hydrolysiert. Das mit Ethanol gefällte Sediment wurde in 80 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,8 und 0,5% (w/v) SDS gelöst. Zu dieser Lösung wurden dann 320 µl 3%ige (w/v) Natriumchlorid-Lösung und Proteinase K (0,1 mg Proteinase K pro 1 A_{260}) gegeben. Die Inkubation erfolgte 10 Minuten bei 37°C. Nach der Inkubation wurde die RNA noch einmal mit 2 Volumina Ethanol bei -40°C gefällt. Das Sediment wurde getrocknet und anschließend mit 40 µl Reservoirpuffer (50 mM Tris-Citrat pH 8,8, 2,5 mM EDTA und 0,2% SDS (w/v)) gelöst, dazu wurde Bromphenolblau als Marker gegeben und 1/2 Stunde bei Raumtemperatur vor dem Laden des Geles für die Elektrophorese geschüttelt.

4.5.3. Partielle RNA-Nachhydrolyse der vernetzten 16S RNA mit RNase H

In einigen Fällen wurde nach der partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 (vgl. 4.5.1.) eine zweite partielle Hydrolyse mit RNase H zur Verkleinerung der vernetzten Fragmente durchgeführt. Das Sediment der UV-vernetzten Probe, die zuvor mit RNase V_1 behandelt wurde, wurde nach Ethanolfällung in 80 µl

10 mM Tris-HCl pH 7,8
0,5 % SDS (w/v)

gelöst. Zu dieser Lösung wurden 320 µl 3%ige (w/v) Natriumchloridlösung gegeben; anschließend erfolgte eine Proteinhydrolyse mit je 100 µl Proteinase K (5 mg/ml). Es wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Phenol-Extraktion der RNA mit 600 µl wassergesättigtem

Phenol bei 4°C über Nacht und unter Schütteln. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase von der Probe abgenommen und anschließend mit Ethanol gefällt. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

Das RNA-Sediment (ca. 1,2 A_{260}) wurde in 16 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,8 gelöst und mit 16 µl Reaktionspuffer

200	mM	Tris-HCl pH 7,8
50	mM	Magnesiumchlorid
0,5	mM	EDTA
0,5	mM	Dithiothreitol
250	mM	Kaliumchlorid und
1	%	Triton X-100

und mit 8 µl (0,4 A_{260}) einer Lösung des Hexadesoxyribonukleotids d-(CTTCCC) (50 A_{260}/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,8) versetzt. 32 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,8 wurden hinzugegeben und anschließend 8 µl einer RNase H-Lösung zugefügt.
Die Reaktion bei 4°C dauerte 18 Stunden; sie wurde mit EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM gestoppt, danach erfolgte eine Ethanolfällung. Nach der Ethanolfällung wurde das Sediment in 40 µl 50 mM Tris-Citrat pH 8,8, 2,5 mM EDTA und 0,2% SDS (w/v) durch halbstündiges Schütteln bei Raumtemperatur gelöst. Nun schloß sich eine Proteinhydrolyse mit je 100 µl Proteinase K (5 mg/ml) an (siehe 4.5.2.).
Die RNase H wurde von Frau B. Greuer nach der Methode von Darlix isoliert (Darlix, 1975). Bei dieser Isolierung entfiel der letzte Reinigungsschritt über eine Säule mit DEAE-Cellulose.
Für die Reaktion wurde eine minimale Enzymkonzentration, die noch eine saubere RNA-Hydrolyse ermöglichte, verwendet. Das Enzym spaltet die RNA spezifisch an der Stelle, an der eine Hybridisierung von DNA-RNA vorliegt (Hausen und Stein, 1970).

4.5.4. Partielle RNA-Hydrolyse der mit N-Lost vernetzten 70S Ribosomen mit RNase V_1

Nach der Trennung der mit N-Lost vernetzten 70S Ribosomen durch Dichtegradienten-Zentrifugation und nach der anschließenden Ethanolfällung wurde das Sediment wie im Falle der durch N-Lost vernetzten 30S Untereinheiten gelöst (vgl. 4.4.1.2.) und mit RNase V_1 behandelt (vgl. 4.5.1., I.).

4.5.5. Partielle RNA-Nachhydrolyse mit RNase T_1

Einige lange, vernetzte RNA-Fragmente wurden nach der Extraktion aus dem 2D-Polyacrylamid Gel (vgl. 4.7.) bei ausreichender Ausbeute (hohe cpm) zusätzlich unter milden Bedingungen mit RNAse T_1 partiell nachhydrolysiert, um eine genauere Analyse des Fragments zu erzielen.
Dieses Enzym spaltet spezifisch einzelsträngige Guanosin-Nukleotide, wie von Whitfeld und Witzel (1963) beschrieben wurde.

Das Sediment wurde in 25 µl

10 mM Tris-HCl pH 7,8 gelöst und mit 25 µl
10 mM Tris-HCl pH 7,8
20 mM Magnesiumchlorid
600 mM Kaliumchlorid

versetzt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 0°C (5 Minuten auf Eis) wurde 10 - 25 ng RNase T_1 zugefügt und 30 Minuten bei 0°C weiterinkubiert. Nach der Inkubation wurde das Enzym mit 10 µl Proteinase K (5 mg/ml) 10 Minuten bei 0°C und 10 Minuten bei 37°C inaktiviert und die hydrolysierte RNA mit Ethanol gefällt.

4.6. Polyacrylamid (PAA) - Gelelektrophorese

Die Trennung und Analyse von RNA Molekülen sowie RNA-Hydrolysefragmenten erfolgte durch verschiedene Gelelektrophoresetechniken.

4.6.1. PAA-Vertikal-Gelelektrophorese

Alle Vertikal-Gele waren 20 cm oder 40 cm lang, 15 cm breit und 1 bzw. 2 mm dick. Alle Gellösungen wurden mit H_2O bidest. hergestellt und vor dem Polymerisieren entgast. Die verwendeten Glasplatten wurden zunächst gereinigt (entfettet) und mit Kunststoff-Streifen (1 cm breit) und einer dünnen Vaseline-Schicht abgedichtet. Als Bodengel wurde schnellpolymerisierendes 20%iges PAA-Gel verwendet.
Die Elektrophoresepufferlösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder angefärbt oder autoradiographiert, geschnitten und für den nächsten experimentellen Schritt (z.B. für die 2D-Gelelektrophorese) vorbereitet.

4.6.1.1. 3 - 15% (w/v) PAA-Gradientengel mit 0,2% (w/v) SDS zur Trennung der hydrolysierten RNA-Fragmente

Die Trennung der hydrolysierten RNA-Fragmente nach einer partiellen RNase V_1- Hydrolyse und nach einer zweiten partiellen Hydrolyse mit RNase H (vgl. 4.5.1. und 4.5.3.) erfolgte in einem 40 cm langen, 20 cm breiten und 2 mm dicken PAA-Gradientengel.

Die Gelzusammensetzung:

3%	bzw. 15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (30:2)
7	M Harnstoff
8%	(w/v) Saccharose
50	mM Tris-HCl pH 7,8
0,2%	(w/v) SDS
2,5	mM EDTA
0,4%	(v/v) DMAPN
0,03%	(w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Nach dem Entgasen der Gellösungen wurde in einem Gradientenmixer durch Zugabe einer 1,6%igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung die Polymerisation gestartet; dann wurden die Lösungen in die Glasplattenkammer gefüllt.
Der Elektrophoresepuffer bestand aus:

150 ml 1 M Tris-Citrat pH 8,8
60 ml 10% SDS
37,5 ml 0,2 M EDTA,

auf 3 l mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Einlaufen der Probe wurde die Spannung 1/2 Stunde bei 300 V gehalten und dann über Nacht auf 250 V geregelt. Der Lauf erfolgte solange, bis der Xylencyanol-Farbmarker 28 cm im Gel gelaufen war. Bei dem sogenannten "langen" Lauf (siehe Ergebnis-Sektion) wurde die Elektrophorese soweit durchgeführt, bis der Xylencyanol-Farbmarker ganz aus dem Gel herausgelaufen war.

4.6.1.2. 2D-Gelelektrophorese zur Trennung der quervernetzten RNA-Fragmente

Nach der Trennung der partiell hydrolysierten RNA-Fragmente durch 1D-Gelelektrophorese (vgl. 4.6.1.1.) wurden diese durch Autoradiographie (vgl. 4.1.3.) sichtbar gemacht und als 1 cm breite, je 24 cm lange Streifen aus dem eindimensionalen Gel herausgeschnitten. Die erste obere Hälfte (0 - 12 cm) des Gels wurde anschließend quer auf die Glasplatte gelegt und mit 10%igem Gel einpolymerisiert, die andere Hälfte (12 - 24 cm) des 1D-Gels wurde ebenfalls quer auf die Glasplatte gelegt und mit 20%igem Gel einpolymerisiert. Das Gel zum Einpolymerisieren wurde nach dem Gilbert-Maxam-System (1977) hergestellt.

Die Zusammensetzung der Gellösung:

	10%	20%
Acrylamid	9,5 g	19 g
Methylen-bis-acrylamid	0,5 g	1 g
Harnstoff	42 g	42 g

1 M Tris-borat pH 8,3 20 mM EDTA	5	ml	5 ml
TEMED	20	µl	20 µl
1,6% APS	5	ml	5 ml
mit bidest Wasser auf	100	ml	100 ml

Ein Aliquot der 20%igen Gellösung mit doppelter Menge an TEMED und APS wurde zum Abdichten des Gels auf der unteren Seite (Sockel) verwendet.

Der Elektrophoresepuffer war:
150 ml 1 M Tris-borat pH 8,3/20 mM EDTA-Stammlösung,mit deionisiertem Wasser auf 3 l aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur bei 600 V durchgeführt, bis der Xylencyanol-Farbmarker aus dem unteren Teil des Gels herausgelaufen war (ca. 20 Stunden).

4.6.1.3. 2 1/2 - 7 1/2% (w/v) PAA-Gradientengel mit SDS, EDTA zur Analyse der "Interface"-Quervernetzungsreaktion

Nach der "Interface"-Quervernetzungsreaktion mit N-Lost in 70S Ribosomen (4.4.1.1.) wurde der 16S-23S RNA Komplex auf einem PAA-Gradientengel analysiert. Das Gel war 20 cm lang, 15 cm breit und 1 mm dick.

Die Zusammensetzung der Gellösung:

2,5	%	bzw. 7,5% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (19:1)
50	mM	Triethanolamin-HCl pH 7,8
0,1	%	(w/v) SDS
2,5	mM	EDTA
0,4	%	(v/v) DMAPN
0,07	%	(w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Die entgasten Gellösungen wurden in einen Gradientenmixer gefüllt und durch Zugabe einer 1,6%igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung polymerisiert.
Der Elektrophoresepuffer bestand aus:

150	ml 1 M Triethanolamin-Citrat pH 8,6
30	ml 10% SDS
37,5	ml 0,2 M EDTA

und wurde mit deionisiertem Wasser auf 3 l Endvolumen gebracht. Die Elektrophorese wurde bei 4°C und 300 V durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Farbmarker 15 cm im Gel gelaufen war. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder gefärbt oder bei Raumtemperatur autoradiographiert. Zur Färbung der RNA-Gele wurden diese eine Stunde in 0,5% (w/v) Methylenblau, 0,25 M Natriumacetat, 0,25 M Essigsäure, 50% (v/v) Ethanol gelegt und danach mit 40%iger Ethanollösung durch mehrfachen Wechsel der Lösung entfärbt.

4.6.2. 10% (w/v) PAA-Gel mit Harnstoff zur Reinigung der nachhydrolysierten RNA

Die RNA-Fragmente wurden, insbesondere nach der Quervernetzungsreaktion mit N-Lost, nach der Extraktion aus dem 2D-Gel mit Ethanol ausgefällt. Für die Nachreinigung wurde ein denaturierendes Gel (20 cm lang, 15 cm breit, 1 mm dick) verwendet.

Die Zusammensetzung der Gellösung:

10	%	(w/v) Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (38:2)
7	M	Harnstoff
50	mM	Tris-Borat/EDTA
0,02	%	(v/v) TEMED
0,08	%	(w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Der Elektrophoresepuffer war der gleiche Laufpuffer wie in 4.6.1.2.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und bei 300 V durchgeführt, bis der Xylencyanol-Farbmarker ca. 10 cm im Gel gelaufen war.

4.6.2.1. 3% (w/v) PAA-Gel mit SDS, EDTA und Harnstoff zur Prüfung der RNA-Unversehrtheit

Dieses Gel wurde als Testgel zur Prüfung der RNA-Unversehrtheit nach der Präparation von ^{32}P-RNA markierten ribosomalen Untereinheiten (vgl. 4.2.) verwendet. Das gleiche Gel, allerdings ohne Harnstoff, wurde als Trenngel bei der Molekulargewichtsbestimmung des vernetzten 16S-23S RNA-Komplexes (vgl. 5.2.1.) verwendet.

Die Zusammensetzung der Gellösung:

9	ml	20% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (19:1)
3,75	ml	6,4% (v/v) DMAPN
3	ml	1 M Tris-HCl pH 7,8
0,6	ml	10% (w/v) SDS
0,75	ml	200 mM EDTA
24,5	g	Harnstoff
24	ml	H_2O bidest.
1,25	ml	1,6% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung

Der Elektrophoresepuffer war der gleiche Puffer wie in 4.6.1.3. beschrieben.

4.6.3. 10% (w/v) PAA-Gel mit SDS und EDTA zur Trennung der nachhydrolysierten RNA

Die partiell mit RNase T_1 nachhydrolysierten RNA-Fragmente (vgl. 4.5.5.) wurden in einem 20 cm langen, 15 cm breiten und 1 mm dicken PAA-Gel getrennt. Die Elektrophorese wurde bei

Raumtemperatur 4 - 5 Stunden bei 200 V durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Farbmarker 12 cm im Gel gelaufen war.

Die Gelzusammensetzung:

32 ml	20% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (19:1)
0,26 ml	100% DMAPN
3,2 ml	1 M Tris-HCl pH 7,8
0,64 ml	10% (w/v) SDS
0,8 ml	200 mM EDTA
28 ml	H_2O bidest.

Zur Polymerisation von 50 ml Gellösung wurden 2,5 ml 1,6% APS-Lösung verwendet. Der Elektrophoresepuffer war der gleiche Puffer wie in 4.6.1.3. beschrieben.

4.7. Extraktion der RNA aus dem Polyacrylamidgel

Mit Hilfe eines Röntgenfilmes wurden die quervernetzten RNA-Fragmente im 2D-Gel sichtbar gemacht, markiert und mit einem halbkreisförmigen Messer oder Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden dann anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt, mit einem Plastik-Spatula zerdrückt und mit 200 µl Extraktionspuffer

10 mM	Tris-HCl pH 7,8
1 mM	Dithiotriethol
1 %	SDS
100 mM	Natriumchlorid

überschichtet. Nach Zusatz von 200 µl destilliertem, wassergesättigtem Phenol wurden die Proben über Nacht bei 4°C stark geschüttelt und nach 30minütiger Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 5400 g) wurde die wässrige Phase abgenommen. 50 µg Träger RNA (tRNA *E. coli* MRE 600) wurden zugesetzt und durch Zugabe von 2,5 Volumina kaltem Ethanol 1 Stunde bei -40°C gefällt.

4.8. Analyse der Quervernetzung in der RNA

Zur Analyse der Quervernetzung wurden die RNA-Fragmente vollständig mit RNasen hydrolysiert, und die entstandenen Oligonukleotide wurden in einem zweidimensionalen System nach Volkaert und Fiers (1977) auf Polyäthylenimin (PEI)-Cellulose Dünnschichtplatten aufgetrennt. Die aus dem 2D-Gel extrahierten und mit Ethanol gefällten RNA-Fragmente (vgl. 4.7.) wurden abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 5400 g, 30 Minuten) und mit 100 µl 80%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Sediment im Vacorot-Lyophilisator lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden in 20 µl 3 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1% (w/v) SDS gelöst und mit 5 µl RNase T_1 (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,8) oder mit 5 µl RNase A (0,5 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,8) versetzt. Nach einer 20minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Temperatur auf 60°C erhöht und die Proben weitere 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben wiederum lyophilisiert.

4.8.1. Oligonukleotidanalyse: "Fingerprint"-Analyse

Die mit RNase T_1 oder mit RNase A total hydrolysierten und anschließend lyophilisierten Proben wurden in 5 µl 0,1% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Xylen-Cyanol-Lösung als Farbmarker gelöst und mit einer Mikropipette auf die PEI-Cellulose DC-Platte aufgetragen. Die Platten waren vorher mit 2 M Ameisensäure/Pyridin pH 2,2 gewaschen, dreimal mit H_2O bidest. gespült und anschließend getrocknet worden.
Für die Chromatographie in beiden Dimensionen wurde ein Vorlauf mit Wasser bis 1 cm über dem Auftragspunkt gemacht, dann erfolgte der Lauf mit dem betreffenden Puffer. Der Laufpuffer in der ersten Dimension enthielt:

33,6 % (v/v) Ameisensäure
5 M Harnstoff.

Der Laufpuffer in der zweiten Dimension enthielt:

1,2 M Ameisensäure/Pyridin pH 4,3
4 M Harnstoff.

Die Chromatographie in der ersten Dimension lief bis 10 cm über den Auftragspunkt; anschließend wurden die Platten zweimal mit Wasser und 70% Ethanol (v/v, technische Qualität) gewaschen und getrocknet. In der zweiten Dimension (rechtwinklig zur ersten Dimension) wurde weiter bis 12 cm über dem Auftragspunkt chromatographiert, danach wurden die Platten wie in der ersten Dimension gewaschen und getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die DC-Platten mit Polyäthylen-Folie überzogen und mit einem Röntgenfilm bei -80°C autoradiographiert (vgl. 4.1.3.). Nach dem Sichtbarwerden der Oligonukleotide wurden die Punkte bzw. Flecken auf der DC-Platte markiert und die dünne Schicht mit Hilfe einer Vakuumpumpe in eine ausgezogene Glaskapillare (Ø 1 mm) gekratzt und gesaugt. Die Radioaktivität der einzelnen Flecke wurde anschließend in einem "Packard"-Szintillationszähler gezählt. Die Oligonukleotide in den Glaskapillaren wurden nach der Zählung mit 50 µl 30%igem Triethylammonium-Carbonat (TEC) pH 10 eluiert.
Die eluierten Oligonukleotide wurden anschließend in einem Exsikkator unter Vakuum lyophilisiert, mit 100 µl Wasser gewaschen und danach wiederum lyophilisiert.

In der ersten Dimension der Fingerprint-Analyse ist die Trennung der T_1-Oligonukleotide von der Anzahl der Basen Uracil (U_p) abhängig. Die Trennung der A-Oligonukleotide in der ersten Dimension hängt von der Anzahl der Basen Guanin (G_p) und der Natur der Basen am 3'-Ende (C_p oder U_p) ab. In der zweiten Dimension werden die Oligonukleotide nach der Kettenlänge der Basen getrennt (Volkaert & Fiers, 1977).

4.8.2. Sekundär-Analyse

Die ausgekratzten, eluierten und lyophilisierten T_1-Proben der ersten Dimension der Fingerprintanalyse (4.8.1.) wurden nun mit RNase A weiterhydrolysiert. Die Proben wurden in 10 µl 10

mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1% (w/v) SDS gelöst, mit 5 µl unmarkierter Träger-RNA E. coli MRE 600, 1 mg/ml) versetzt und mit 2 µl RNase A (1 mg/ml, in 10 mM Tris-HCl pH 7,8) hydrolysiert und dann 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Proben, die in der Fingerprintanalyse mit RNase A behandelt worden waren, wurden dann der Sekundäranalyse mit RNase T_1 vollständig hydrolysiert. Die Hydrolysebedingungen waren die gleichen wie bei der Hydrolyse mit RNase A (siehe oben). In beiden Fällen wurden die Proben nach der Inkubation lyophilisiert, in 5 µl 0,1% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Xylen-Cyanollösung gelöst und auf PEI-Celluloseplatten (6,6 x 9,9 cm) aufgetragen. Es wurden die gleichen Platten wie für die Fingerprintanalyse verwendet. Nach einem kurzen Vorlauf in Wasser (bis ca. 0,5 cm über dem Auftragspunkt) erfolgte die Chromatographie mit dem Laufmittel 22%ige Ameisensäure. Nach dem Trocknen der Platten wurden diese hochkant in der zweiten Dimension chromatographiert. Der Vorlauf wurde in einer Lösung aus 0,1 M Ameisensäure/Pyridin pH 4,3 (bis ca. 0,5 cm über dem Auftragspunkt) durchgeführt. Danach wurde unmittelbar weiter in 1 M Ameisensäure/Pyridin pH 4,3 chromatographiert und anschließend getrocknet. Nach dem Trocknen erfolgte eine Autoradiographie bei -80°C.

Interpretation der RNA-Sequenzen

Nach der Analyse der Autoradiographiebilder von der primären und sekundären Hydrolyse folgte die Identifizierung der quervernetzten Oligonukleotide innerhalb der RNA-Sequenzen. Dafür wurden die 16S und 23S RNA-Sequenzen von Brosius et al. (1978 und 1980) benutzt. Die Molarität der Fragmentprodukte wurde auf folgende Weise abgeschätzt:
Zunächst wurde die Radioaktivität (cpm) aller Flecken im Fingerprint addiert, dies ergab die Summe X. Die spezifische Aktivität der Phosphorgruppe Y ergab sich durch Dividieren der Summe X durch die Anzahl der Nukleotide in dem betreffenden

Fragment Z. Die Anzahl der Phosphatmoleküle der Oligonukleotide M ergab sich schließlich durch Dividieren der Radioaktivität der einzelnen Oligonukleotide R durch die spezifische Aktivität der Phosphorgruppe Y. Zusammengefaßt läßt sich die Molaritätsabschätzung mit folgenden Formeln berechnen:

$$\text{I)} \quad Y = \frac{X}{Z}$$

$$\text{II)} \quad M = \frac{R}{Y}$$

4.8.3. Tertiäranalyse

Zur Untersuchung einiger untypischer Flecken bei der Sekundäranalyse (vgl. Ergebnis-Sektion) wurde eine tertiäre Analyse durch Hydrolyse der Flecken mit RNase T_2 durchgeführt (Zwieb und Brimacombe, 1979). Zunächst wurden die Flecken der Sekundäranalyse aus der PEI-Celluloseplatte ausgekratzt, gezählt, eluiert und anschließend lyophilisiert (vgl. 4.8.1.). Nach der Lyophilisation wurde die Probe in 10 µl

100 mM Ammoniumacetat pH 4,5
0,1 % (w/v) SDS
2 mM EDTA

gelöst; zu dieser Lösung wurden 5 µg Träger-RNA und anschließend 2 µl RNase T_2 (1000 U/ml) zugesetzt.
Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Probe lyophilisiert und mit 5 µl H_2O bidest., 0,01% (w/v) Xylen-Cyanol gelöst und auf einer PEI-Cellulose Dünnschichtplatte getrennt. Das Laufmittel war: 10% (v/v) Essigsäure/1,4% (v/v) Pyridin pH 3,7 (Bernardi, 1974). Die einzelnen Nukleotide A, G, C, U liefen parallel als Referenzen mit. Nach der Chromatographie wurde die Dünnschichtplatte getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

4.9. Raummodellbau der RNA Moleküle

Anhand der durch die Vernetzungsreaktionen gewonnenen Informationen, insbesondere denen über die Tertiärstruktur der RNA Moleküle, sollte ein räumliches Drahtmodell konstruiert werden.
Ein in blauen Kunststoff eingehüllter Draht (Ø = 3 mm), der das Phosphor-Rückgrat der RNA Moleküle darstellte, wurde zunächst in Abständen von je 15 mm (2 mm ≙ 1Å) mit verschiedenen Lackfarben, die den einzelnen Nukleotiden entsprechen sollten (z.B. rot für Adenin, gelb für Guanin, grün für Cytosin, weiß für Uracil) markiert. Diese Markierungen wurden für jeweils 120 Nukleotide auf einem Draht von jeweils 180 cm Länge angebracht. Nachdem alle Nukleotide entsprechend den Primärsequenzen der 16S- und 23S RNA (mit 1542 bzw. 2904 Nukleotiden) gekennzeichnet waren, wurde das Drahtmodell anhand der Sekundärstrukturmodelle der 16S- (Maly und Brimacombe, 1983) und der 23S RNA (Maly und Brimacombe, 1983) konstruiert.

Zunächst wurden Plexiglas-Röhren (Außendurchmesser 40 mm, Innendurchmesser 34 mm) in verschiedene Längen geschnitten. Die danach in diesen Rohrstücken befestigten markierten Drähte sollten die doppelhelikalen Segmente der RNA darstellen. Die Länge einer Plexiglas-Röhre hing von der Anzahl der Basenpaarungen in den Helices ab; für 10 Basenpaarungen innerhalb einer rechts drehenden Helix wurde z.B. eine Länge von 68 mm benötigt. An den Punkten, an denen jeweils Anfangs- und Endnukleotid eines markierten Drahts befestigt werden sollten, wurde eine Rille eingekerbt. Die so gebauten Helices wurden einzeln numeriert. Die nicht basengepaarten Nukleotide wurden in Schleifen, dem Sekundärstrukturmodell entsprechend, gefaltet. Auf diese Weise wurden die einzelnen Teilstücke der RNA Moleküle nach und nach mit Hilfe von Drahtverbindungsstücken in ihre Domäne eingefügt. Dann wurden die einzelnen Domänen der RNA Moleküle in einem Drahtkäfig (60 x 60 x 50 cm) mit Fäden befestigt; die 5'- und 3'-Enden der Moleküle wurden markiert.
Nun wurde versucht, die auf diese Weise entstandene Sekundärstruktur der RNA Moleküle anhand der experimentell erziel-

ten RNA-RNA Vernetzungsergebnisse in eine dreidimensionale Form zu falten. Abschließend wurden bei diesem Modell die einzelnen Helices und die Domänen anhand der RNA-Protein-Vernetzungen (sofern die intramolekularen RNA Vernetzungen dies erlaubten) in die Lage gebracht, die am besten mit den 30S- (Breitenreuter et al., 1984) und 50S-Modellen (Stöffler-Meilicke, 1983) übereinstimmten.

5. ERGEBNISSE

5.1. Intramolekulare RNA Vernetzung in 30S ribosomalen Untereinheiten

5.1.1. Quervernetzung durch UV-Bestrahlung innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten

Möller und Brimacombe (1975) konnten eine Quervernetzung zwischen 16S RNA und Protein identifizieren, die durch ultraviolette Bestrahlung der 30S Untereinheiten entstanden war. Seitdem wurde versucht, UV-induzierte RNA-RNA Quervernetzungen innerhalb der 30S Untereinheiten zu analysieren. Zwieb et al. (1978) hatten die durch die UV-Bestrahlung von 50S Untereinheiten induzierten 23S RNA-Vernetzungen zwar nachgewiesen, konnten jedoch die RNA-Bereiche, die miteinander quervernetzt waren, nicht genau identifizieren. Durch Modifizierung der bereits entwickelten Methode zur Trennung der RNA-Protein Vernetzungen konnten Zwieb und Brimacombe (1980) eine Reihe von Quervernetzungen innerhalb der 16S RNA lokalisieren, die alle gut die Sekundärstruktur der RNA bestätigten. Da sich die Analyse weiterer Quervernetzungen nach dieser Methode als nicht einfach erwies (u.a. wegen zu geringer Ausbeute der vernetzten Produkte),war eine Verbesserung der Methode notwendig. Bei seinen Experimenten hatte Stiege (Dissertationsarbeit, 1984) ebenfalls versucht, Quervernetzungen durch UV-Bestrahlung in 30S Untereinheiten zu induzieren. Mit der von ihm verbesserten Methode konnte er eine Reihe von Vernetzungen innerhalb der 16S RNA nachweisen. Die isolierten quervernetzten RNA-Fragmente hatten eine Länge von etwa 50 bis 500 Nukleotiden und stammten hauptsächlich aus dem Nukleotid-Bereich 400 - 600 der 16S RNA. Es konnte aber in keinem Fall eine Vernetzungsstelle genau identifiziert werden.

5.1.1.1. Isolierung der durch UV-Bestrahlung vernetzten 16S RNA-Fragmente

Es wurden 30S ribosomale Untereinheiten, deren RNA mit ^{32}P markiert worden war, für die Quervernetzung durch UV-Strahlung verwendet (vgl. 4.4.2.). Nach der UV-Vernetzung der 30S Untereinheiten erfolgte die partielle Hydrolyse der RNA mit RNase V_1 (Vassilenko und Ryte, 1975) unter milden Bedingungen. Die daraus entstandenen RNA-Fragmente wurden dann in einem zweidimensionalen Gelsystem getrennt (vgl. 4.6.1.2.). Zur besseren Trennung der vernetzten RNA-Fragmente wurde auch ein langer 1D-Gelelektrophoreselauf (vgl. 4.6.1.1.) durchgeführt. Die vernetzten RNA-Fragmente erschienen dabei als Flecken oberhalb der "Diagonale" (Abb. 10a), deren Muster gut reproduzierbar war. Sie wurden danach einzeln aus dem 2D-Gel extrahiert und isoliert.
Zur Analyse der Vernetzung wurde die RNA im "mini fingerprint"-System sequenziert. Die analysierten Fragmente wurden mit den Großbuchstaben A bis E bezeichnet (vgl. Abb. 10a und b). Manche Quervernetzungsstellen traten in mehreren Fragmenten auf, die sich nur in ihrer Länge unterschieden. Sie wurden zusätzlich numeriert, z.B. D1 bis D7.

5.1.1.2. Analyse der durch UV-Bestrahlung vernetzten 16S RNA Fragmente

Die oben bereits erwähnten, durch UV-Bestrahlung erhaltenen Fragmente A, B, C, D1-4 stammten aus dem oberen Teil einer langen 1D-Gelelektrophorese (vgl. 4.6.1.1.). In einigen Fällen wurden die RNA-Fragmente zusätzlich einer partiellen Hydrolyse mit RNase H unterzogen. Sie wurden anschließend wiederum in einem 2D-Gelsystem getrennt, und dabei wurden Fragmente, wie z.B. D5, D6, D7 und E, erhalten (vgl. Abb. 10b).

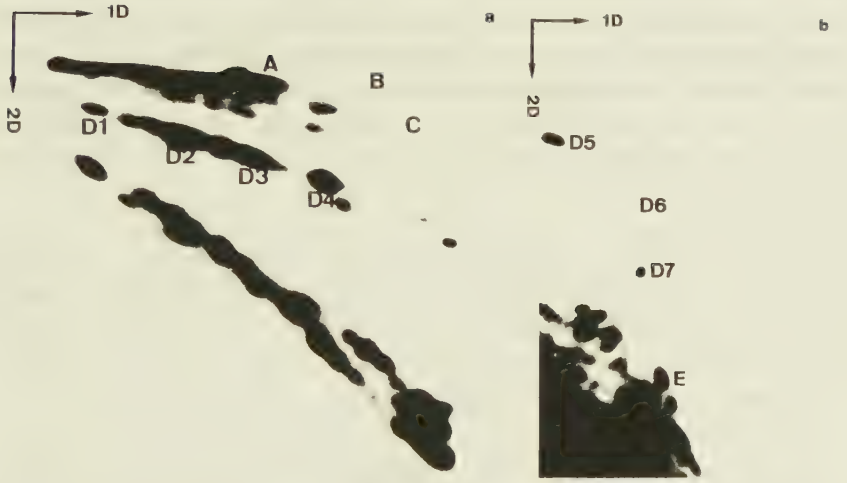


Abb. 10: Trennung der UV-vernetzten Fragmente in einem zweidimensionalen Gelelektrophoresesystem. Die Elektrophorese erfolgte in der 1. Dimension von links nach rechts und in der 2. Dimension von oben nach unten. Abb. 10a zeigt das 2D-Gel, in dem der obere Teil des 1D-Gelstreifens nach der partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 (vgl. 4.5.1.) in einem 10%igen Polyacrylamid(PAA)-Gel polymerisiert und getrennt wurde. Abb. 10b zeigt das 2D-Gel (20% PAA), das dem unteren Teil des 1D-Gelstreifens nach einer partiellen Hydrolyse mit einer Kombination aus RNase V_1 und RNase H (vgl. 4.5.3.) entspricht.

Fragment A

Dieses UV-vernetzte Fragment trat im 2D-Gel immer als starker Fleck auf (hohe Radioaktivität). Er lag im 2D-Gel ziemlich weit oben links (vgl. Abb. 10a), was darauf hindeutet, daß es sich hier um ein großes Fragment (etwa 340 Nukleotide) handelt. Bei solchen großen Fragmenten konnten die genauen 5'-

und 3'-Enden nach der totalen Hydrolyse mit RNase T_1 oder RNase A im Fingerprintsystem (vgl. 4.8.1.) nicht genau identifiziert werden. Außerdem war es sehr schwierig, bei derart langen Fragmenten die Vernetzungsstelle präzise zu lokalisieren. Die aus dem Fragment erhaltenen RNase T_1-Fingerprint-Flecken (Abb. 11) wurden nun der 16S RNA-Sequenz (nach Brosius et al., 1978) zugeordnet.

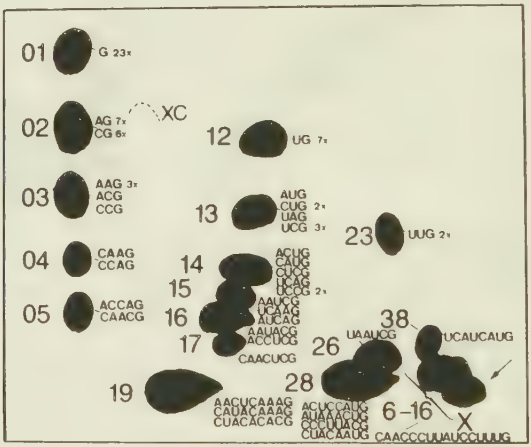


Abb. 11: Autoradiographie des RNase T_1-Fingerprints vom vernetzten Fragment A. Die Chromatographie-Trennung erfolgte in der 1. Dimension von rechts nach links und in der 2. Dimension von unten nach oben. Der Probenauftragspunkt ist mit einem Pfeil markiert; XC zeigt die Position des mitaufgetragenen Xylencyanols als Farbmarker. Die Klassifizierung der Flecken (01, 02, ... usw.) erfolgte nach Uchida et al. (1974); die Sequenzen der in ihnen enthaltenen Oligonukleotide sind rechts neben den Flecken angegeben.

Zunächst wurde ein charakteristisches Oligonukleotid im Fingerprint gesucht, das in der 16S RNA in dem gefundenen Bereich

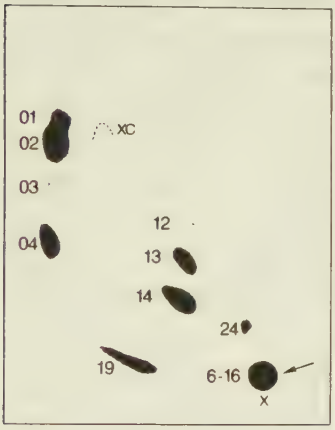
nur einmal vorkommt. In diesem Fall wurde ein solches Oligonukleotid in Fleck 17 (nach Uchida et al., 1974) gefunden; ein Fleck, der ein U enthält und 7 Nukleotide lang ist (vgl. Abb. 11). Die Sekundäranalyse dieses Fleckes lieferte AAC, C, U und G mit den relativen Phosphat-Intensitäten 3:2:1:1. Ein Oligonukleotid mit dieser Zusammensetzung kommt in der 16S RNA nur einmal vor, und zwar CAACUCG in Position 1317-1323.

Danach erfolgte die Zuordnung der anderen im Fingerprint vorhandenen Flecke. Links von diesem charakteristischen Oligonukleotid sind zum Beispiel zwei markante Oligonukleotide, nämlich AUUG und UCUG, die beide im T_1-Fingerprint als Fleck 24 erscheinen (vgl. Abb. 11),zu sehen. Ebenfalls sind die rechts neben CAACUCG liegenden Oligonukleotide ACUCCAUG (Fleck 28), AAUCG (Fleck 15) und UAAUCG (Fleck 26) im T_1-Fingerprint erkennbar. Auf diese Weise wurde dann die Zuordnung der Flecke nach und nach erweitert, bis das 5'- und 3'-Ende des betreffenden Fragments gefunden wurde. Hier muß noch einmal darauf hingewiesen werden, daß es bei solch langen Fragmenten schwierig ist, die Enden des Bereichs und die Vernetzungsstelle genau zu bestimmen. Das 5'-Ende dieses Bereichs könnte etwa an der bekannten RNase V_1-Schnittstelle in der Position 1020 (Vassilenko et al., 1981) und das 3'-Ende in der Position 1357-1361 liegen.

Nach der Eingrenzung des Bereiches wurden nun die vernetzten Oligonukleotide gesucht. Ohne Zweifel fehlte hier das Oligonukleotid ACCUCAUAAAG (2-11), Pos. 1280-1290. Der zweite Vernetzungspartner konnte allerdings nicht eindeutig aus dem T_1-Fingerprint identifiziert werden. Da dieses große Fragment immer in hoher Ausbeute isoliert werden konnte, war es möglich, es durch eine partielle Nachhydrolyse mit RNase T_1 (vgl. 4.5.5.) zu verkleinern. Aus dieser zweiten partiellen Hydrolyse entstanden mehrere kürzere Fragmente, die wiederum in einem zweidimensionalen Gelelektrophoresesystem getrennt wurden. Die daraus entstandenen vernetzten Tochterfragmente, die im 2D-Gel (Abb. 12) zu sehen sind, wurden als Fragment A_2 und A_3 be-

zeichnet. Sie wurden aus dem 2D-Gel extrahiert, isoliert, im Fingerprintsystem sequenziert und weiter analysiert. Erst durch die Analyse der Tochterfragmente konnte nun der zweite Vernetzungspartner gefunden werden.

Abb. 12: 2D-Trennung der vernetzten Tochterfragmente (A_2 und A_3), die durch RNase T_1-Nachhydrolyse aus dem Fragment A erhalten wurden. Die Analyse der Vernetzungsstelle wurde aus dem Tochterfragment A_3 gemacht (vgl. Text).



01	G 7x	12	UG	24	AUUG
02	AG 2x CG 4x	13	UCG UAG		
03	CCG	14	UCCG 2x		
04	CAAG CCAG	19	AACUCAAAG		

Startpunkt : CAACCCUUAUCCUUUG (6-16)

X : UUG x ACCUCAUAAAG

Abb. 13: RNase T_1-Fingerprint des Tochterfragments A_3, das nach einer Nachhydrolyse des Mutterfragments A erhalten wurde. Der vernetzte Fleck bleibt am Startpunkt (⟶) zurück (vgl. Text).

Tabelle 1: Die aus Fragment A_3 entstandenen Oligonukleotide nach der totalen Hydrolyse mit RNase T_1; die Klassifizierung der Oligonukleotide erfolgte nach Uchida et al. (1974).

Anhand der Analyse des A_3-Fingerprints konnten zwei kleinere, entfernt liegende RNA Bereiche (1105-1153 und 1272-1309) identifiziert werden. Innerhalb des ersten Bereichs (1105-1153) fehlte eindeutig das Oligonukleotid UUG (1125-1127), innerhalb des zweiten Bereichs fehlte nach wie vor das im Mutterfragment A abwesende Oligonukleotid ACCUCAUAAAG (2-11), Pos. 1280-1290.

Das vernetzte Produkt bestand aus UUG x ACCUCAUAAAG und war im T_1-Fingerprint mit dem langen Oligonukleotid CAACCCUUAUCCUUUG (6-16), Pos. 1109-1124, zusammen in dem Startfleck.
Die Sekundäranalyse des Startflecks nach Hydrolyse mit RNase A

lieferte C, U, G, AU, AAC und AAAG in erwarteten relativen Phosphat-Intensitäten sowie einen unverdauten Fleck Y am Startpunkt (vgl. Abb. 14).

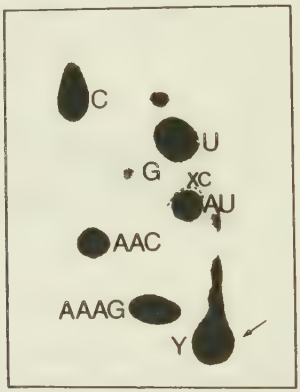


Abb. 14: Autoradiographie der Sekundäranalyse des Startflecks aus dem T_1-Fingerprint von A_3 (vgl. auch Abb. 13). Die Sekundäranalyse wurde nach der Hydrolyse eines T_1-Fingerprintflecks mit RNase A erhalten. Die Trennung wurde auf PEI-Cellulose-platten vorgenommen; die Chromatographie erfolgte in der 1. Dimension von rechts nach links und in der 2. von unten nach oben. Der Auftragspunkt wurde mit einem Pfeil markiert; die Laufposition des Farbmarkers wurde mit XC bezeichnet. Der Fleck Y am Startpunkt enthält das vernetzte Oligonukleotid (vgl. Text).

Das Oligonukleotid AC war in der Sekundäranalyse nicht vorhanden (vgl. Abb. 14). Das bedeutet, daß die Vernetzung zwischen UUG (Pos. 1125-1127) und AC (Pos. 1280-1281) aus dem Oligonukleotid ACCUCAUAAAG (Pos. 1280-1290) stattgefunden haben muß. Diese Annahme wird auch durch die Anwesenheit von AAAG in der Sekundäranalyse unterstützt. Außerdem konnte die Vernetzungsstelle durch die Abwesenheit von GGAC (1278-1281) in der RNase

A-Fingerprintanalyse des Mutterfragments gezeigt werden. Der Fleck Y aus der Sekundäranalyse läuft in der Position, in der das vernetzte Oligonukleotid UUG x AC erwartet wurde. Er konnte wegen zu geringer Radioaktivität nicht weiter mit RNase T_2 zur Tertiäranalyse hydrolysiert werden.

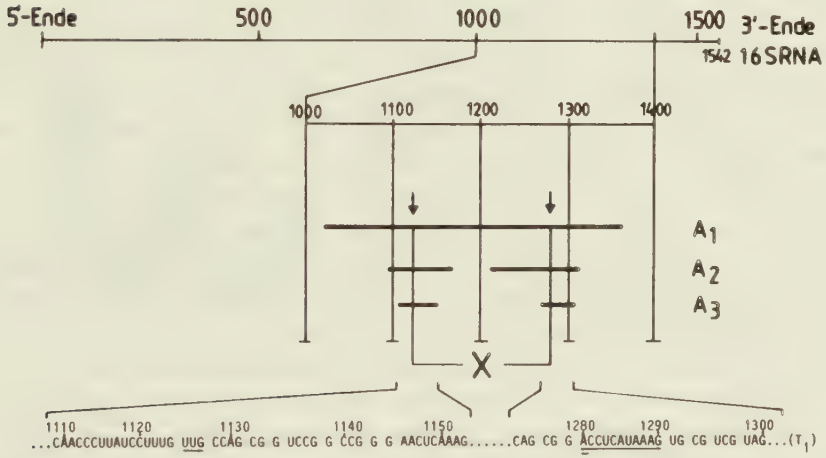
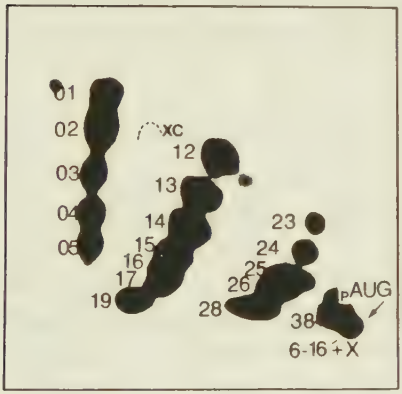


Abb. 15: Lokalisierung der RNA-Bereiche der vernetzten A-Fragmente in der 16S RNA. Die Sequenz ist vom 5'-Ende an numeriert (oberste Skala). Zur besseren Identifizierung wurde der RNA-Bereich gespreizt (untere Skala). Die RNA-Bereiche der bezeichneten Fragmente wurden als Balken dargestellt. Die Vernetzungsstellen sind durch zwei senkrechte, miteinander verbundene Linien und durch ein "X" gekennzeichent. Der untere Teil der Abbildung zeigt die detaillierten RNA-Bereiche der 16S RNA in dem gespreizten Ausschnitt mit der jeweiligen Vernetzungsstelle; es sind RNase T_1- Oligonukleotide zu sehen. Die vernetzten T_1- Oligonukleotide sind unterstrichen, die doppelt unterstrichenen zeigen präzise die vernetzten Nukleotide.

Fragment B

Fragment B ist etwa 240 Nukleotide lang. Im 2D-Gel (Abb. 10a) liegt es rechts neben dem Fragment A.
Das 5'- und das 3'-Ende dieses langen Fragments konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Durch die Anwesenheit des Oligonukleotids CCUUCG (1027-1032) und des V_1-Schnittendstücks pAUG (1022-1024) im RNase T_1 -Fingerprint (vgl. Abb. 16) kann jedoch angenommen werden, daß das 5'-Ende an der RNase V_1-Schnittstelle in Position 1020 (Vassilenko et al.,1981) liegen müßte. Das 3'-Ende wäre etwa bei Position 1260 anzuordnen. Im Gegensatz zu Fragment A trat dieses Fragment nur in sehr geringer Ausbeute (wenige cpm) auf. Es war deshalb nicht möglich, das Fragment durch eine partielle Nachhydrolyse weiter zu verkleinern; trotzdem konnte sowohl eine RNase T_1 - als auch eine RNase A-Fingerprintanalyse durchgeführt werden.
Eine Vernetzungsstelle wurde durch das Fehlen von UUAAG (Oligonukleotid Nr.25; siehe Tab. 2), Pos. 1090-1094, im RNase T_1-Fingerprint gefunden.
Den Hinweis auf den anderen vernetzten Partner lieferte das fehlende Oligonukleotid CCAG (Nr.04 in Tab. 2), das nach Molaritätsabschätzung dieses Bereiches nur einmal statt zweimal gefunden wurde. Durch die Abwesenheit des Oligonukleotids AGU (Position 1163-1165) in der RNase A-Fingerprintanalyse konnte weiter festgestellt werden, daß es sich bei dem fehlenden Oligonukleotid um CCAG (1161-1164) handelte. Das vernetzte Oligonukleotid bestand also aus UUAAG x CCAG. Innerhalb des vernetzten Oligonukleotids CCAG ist eine potentielle V_1-Schnittstelle vorhanden, nämlich in Position 1162 (Vassilenko et el.,1981). Falls die RNase V_1 innerhalb des vernetzten Oligonukleotids genau an der genannten Stelle schneiden würde, müßte das Oligonukleotid pAG im T_1-Fingerprint zu sehen sein. Dies wurde jedoch in keiner Analyse bestätigt. Die Fingerprintanalyse von Fragment B gestaltete sich besonders in den Regionen um den Startpunkt nicht einfach, da hier das vernetzte Oligonukleotid mit dem langen Oligonukleotid CAACCCUUAUCCUUUG (6-16) zusammenlief. Deshalb war es auch nicht möglich, die

vernetzten Oligonukleotide in der Sekundäranalyse eindeutig nachzuweisen.
Die Vernetzungsstelle konnte deshalb lediglich anhand der fehlenden Oligonukleotide UUAAG (1090-1094) und CCAG (1161-1164) identifiziert werden.



01	G 21X	12	UG	23	UUG	38	UCAUCAUG
02	AG 5x CG 4x	13	AUG CUG 2x UCG	26	CCUUCG		
03	AAG 2x ACG CCG	14	ACAG ACUG CAUG CUCG UCCG	28	AUAAACUG CUACAAUG CCCUUACG		
04	ACAG CCAG						
05	AACCG ACCAG CAACG	15	AAAUG UCCCG				
		19	AACUCAAAG CAUACAAAG CUACACACG				

Startpunkt : CAACCCUUAUCCUUUG (6-16)
X : UUAAG x CCAG

Abb. 16: T_1-Fingerprint des UV-vernetzten Fagments B. Der Fleck X bleibt zusammen mit dem langen Oligonukleotid CAACCCUUAUCCUUUG (6-16) am Startpunkt zurück (vgl. Text.).

Tabelle 2: Die nach der Totalhydrolyse durch RNase T_1 erhaltenen Oligonukleotide des Fragments B.

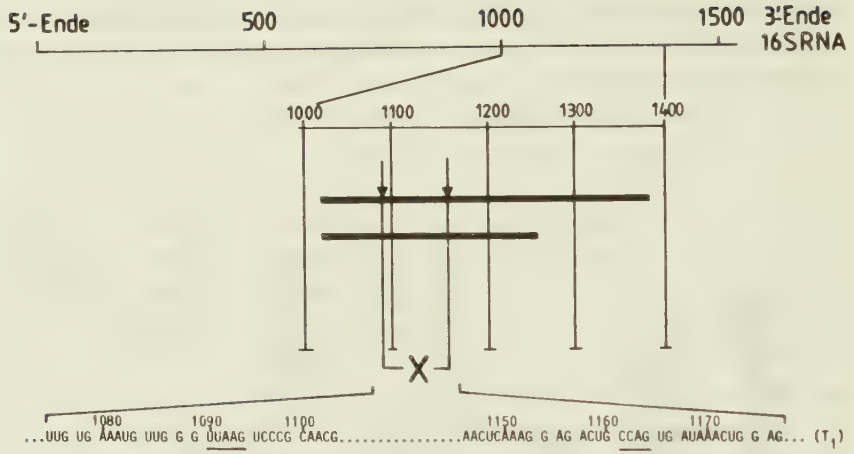
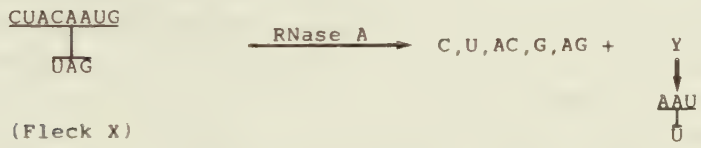


Abb. 17: Darstellung des 16S RNA-Bereichs von Fragment B. Die Vernetzungsstelle X liegt innerhalb der hier gespreizt dargestellten Sequenz; die unterstrichenen Sequenzen zeigen die vernetzten Oligonukleotide (vgl. Text).

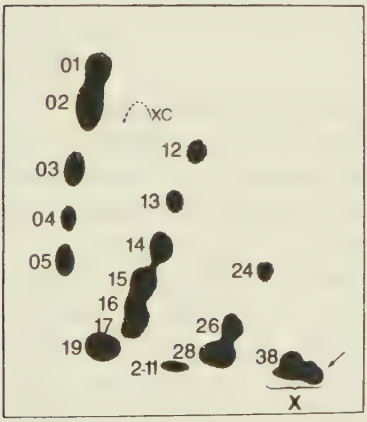
Fragment C

Fragment C liegt etwa zwischen den Positionen 1160-1400 der 16S RNA. Innerhalb dieses Bereiches liegen zwei RNase-V_1 Schnittstellen (Position 1162 und 1389; Vassilenko et al., 1981), die die Begrenzung des Fragments darstellen könnten. Fragment C konnte aus dem zweidimensionalen Gel nur in geringer Menge isoliert werden, weshalb eine Verkleinerung durch eine Nachhydrolyse nicht möglich war. In der T_1-Fingerprintanalyse (vgl. Abb. 18) sind alle Oligonukleotide mit Ausnahme von CUACAAUG (1234-1241) und UAG (1298-1300) eindeutig anwesend. Innerhalb des Bereiches 1160-1400 kommt UAG nur einmal vor. Das vernetzte Oligonukleotid muß daher CUACAAUG x UAG sein; es ist im T_1-Fingerprint als Fleck X am Startpunkt zu

sehen. Die Sekundäranalyse dieses Fleckes nach Hydrolyse mit RNase A ergab C, U, G, AC und AG mit den entsprechenden relativen Phosphat-Intensitäten und einen unhydrolysierten Fleck Y; das Oligonukleotid AAU wurde nicht gefunden. Da aber AG vorhanden war, kann nur das U der zweite Vernetzungspartner sein. Das vernetzte Oligonukleotid muß also wie folgt aussehen: AAU x U. Außerdem entspricht auch die Laufposition des unverdauten Flecks Y in der Sekundäranalyse der Position, die ein Oligonukleotid dieser Zusammensetzung haben müßte.
Das folgende Reaktionsschema verdeutlicht dies noch einmal:



RNase T_1-Fingerprintanalyse



Sekundäranalyse

01	G 17x	12	UG 6x	24	AUUG	38	UCAUCAUG
02	AG 5x CG 5x	13	AUG UCG	26	UAAUCG UUCCCG		
03	AAG 3x ACG	14	AAUG UCCG	28	ACUCCAUG CCCUUACG		
04	m CCCG CAAG	15	AAUCG AUCAG UCAAG	2-11	ACCUCAUAAAG		
05	ACCAG CCACG	16	ACCUCG AAUACG				
		17	CAACUCG				
		19	CAUACAAAG CUACACACG UACACACCG				

X : CUACAAUG x UAG

Abb. 18: T_1-Fingerprint des Fragments C. Der vernetzte Fleck X bleibt am Startpunkt zurück (vgl. Text)

Tabelle 3: Die nach Hydrolyse mit RNase T_1 entstandenen Oligonukleotide des Fragments C.

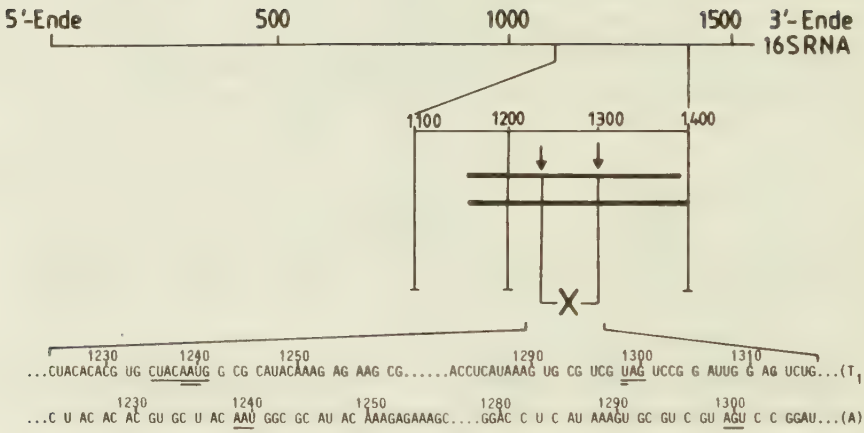

5'-Ende
500
1000
1500
3'-Ende
16SRNA
1100
1200
1300
1400
X
...CUACACACG UG CUACAAUG G CG CAUACAAAG AG AAG CG.....ACCUCAUAAAG UG CG UCG UAG UCCG G AUUG G AG UCUG...(T1)
...C U AC AC AC GU GC U AC AAU GGC GC AU AC AAAGAGAAAGC....GGAC C U C AU AAAGU GC GU C GU AGU C C GGAU...(A)

Abb. 19: Lokalisierung der RNA-Bereiche des Fragments C. Die RNase T_1- und RNase A-Oligonukleotide wurden zur besseren Identifizierung mitaufgeführt. Die doppelt unterstrichenen Nukleotide markieren die genau identifizierten Vernetzungsstellen (vgl. Text).

Fragment D

Nach der UV-Vernetzung der 30S ribosomalen Untereinheiten wurde die Probe geteilt. Die erste Hälfte wurde einer partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 unterzogen; nach der Trennung der hydrolysierten RNA im 2D-Gelsystem entstanden die Fragmente D1-4 (vgl. Abb. 10a). Der zweite Teil wurde mit einer Kombina-

tion aus RNase V_1 und RNase H partiell hydrolysiert; nach der 2D-gelelektrophoretischen Trennung entstanden die Fragmente D5-7 (vgl. Abb. 10b). Sämtliche Fragmente kommen in unterschiedlichen Längen vor; sie stammen jedoch alle aus dem RNA-Bereich um Position 500. Dies kann aus der Anwesenheit eines typischen Fleckes, der im T_1-Fingerprint links neben dem Fleck mit der Klassifizierung 03 (siehe Abb. 20) liegt, geschlossen werden. Dieser Fleck enthält das Oligonukleotid CCm^7G (Position 525-527), dessen Guanosin am N-7 methyliert ist (Carbon et al., 1979).

Ein eindeutiger Hinweis auf eine Vernetzung konnte aus der Analyse des Fragments D5 gewonnen werden; es ist etwa 100 Nukleotide lang. Das 5'-Ende dieses Fragments konnte durch die Anwesenheit des Oligonukleotids AU im RNase A-Fingerprint lokalisiert werden; es handelt sich hier um eine der RNase V_1-Schnittstellen im Oligonukleotid CUCAUUG (Pos. 475-481) in der Position 477 (Vassilenko et al., 1981). Durch die Anwesenheit eines Flecks im T_1-Fingerprint links neben dem Fleck mit der Klassifizierung 02 (vgl. Abb. 20), der der Zusammensetzung $UAAA_{OH}$ entspricht, konnte das 3'-Ende (Pos. 574) identifiziert werden.

Sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende des Fragments beinhalten Sequenzen, die mit denen für die RNase H-Hydrolyse notwendigen komplementären DNA-Sequenzen d-(CTTCCC) gepaart sein können. Um als Substrat für die RNase H wirken zu können, werden mindestens vier Basenpaarungen verlangt (Donnis-Keller, 1979). Die Abwesenheit des Oligonukleotids CAAG (545-548) in der T_1-Fingerprintanalyse lieferte einen Hinweis auf einen der Vernetzungspartner. Nach einer Molaritätsabschätzung wurde außerdem zu wenig AAG gefunden, was darauf schließen ließ, daß ein Oligonukleotid dieser Zusammensetzung der zweite Partner sein mußte.

Ein Fleck im T_1-Fingerprint war nicht einzuordnen; er wurde mit X bezeichnet (vgl. Abb. 20). Von der Laufposition im

T_1-Fingerprint her konnte der Fleck X weder der O-Reihe (Reihe ohne U-Nukleotid; Uchida et al., 1974) noch der 1-Reihe (Reihe mit einem U-Nukleotid; Uchida et al., 1974) zugeordnet werden. Nach der Molaritätsabschätzung mußte der Fleck X etwa 6 Nukleotide enthalten. Die Sekundäranalyse dieses Fleckes lieferte nach der Hydrolyse mit RNase A ein C und einen untypischen Fleck Y mit den erwarteten relativen Phosphat-Intensitäten. Es lag nahe, daß der Fleck Y das vernetzte Produkt, bestehend aus den Oligonukleotiden CAAG und AAG, enthalten mußte.
Folgendes Reaktionsschema soll dies noch einmal verdeutlichen:

$$\begin{array}{c}\text{AAG}\\|\\\text{CAAG}\end{array} \xrightarrow{\text{RNase A}} \text{C} + \begin{array}{c}\text{AAG}\\|\\\text{AAG}\end{array} \qquad \text{(I)}$$

(Fleck X) (Fleck Y)

RNase T_1-Fingerprintanalyse Sekundäranalyse

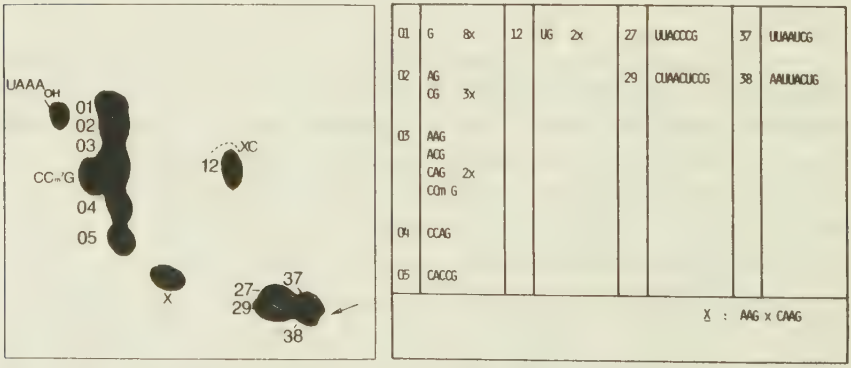


Abb. 20: T_1-Fingerprint des Fragments D5, das nach der Hydrolyse mit einer Kombination aus RNase V_1 und RNase H erhalten wurde. Der vernetzte Fleck wurde mit X bezeichnet (siehe Text).

Tabelle 4: Die Oligonukleotide nach der T_1-Totalhydrolyse des Fragments D5.

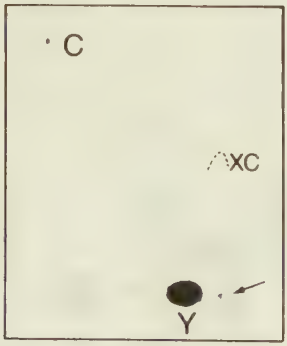


Abb. 21: Sekundäranalyse des Fleckes X nach Hydrolyse mit RNase A. Neben dem Nukleotid C wurde der Fleck Y gefunden (vgl. Text).

Die Auswertung der RNase A-Fingerprintanalyse ergab eindeutig die Abwesenheit des Oligonukleotids AAGC (Pos. 546-549). Hier erschien der Vernetzungskomplex als ein etwas verzogener Fleck in der Laufposition, in der man normalerweise ein Oligonukleotid mit der Zusammensetzung AGAAGAAGC erwartet hätte (vgl. Abb. 22).
Die Sekundäranalyse dieses vernetzten Komplexes lieferte nach der Hydrolyse mit RNase T_1 ein C, ein AG und einen unhydrolysierten Fleck Y. Das Oligonukleotid AAG wurde hier nicht gefunden (vgl. Abb. 23). Es konnte daher die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der Vernetzungskomplex aus AGAAGAAGC (493-501) und AAGC (546-549) bestehen muß.
Dies wird durch das Reaktionsschema noch einmal verdeutlicht:

$$\underset{\text{AAGC}}{\overset{\text{AGAAGAAGC}}{|}} \xrightarrow{\text{RNase } T_1} \text{C} + \text{AG} + \underset{\text{AAGC}}{\overset{\text{AAGAAG}}{|}} \qquad \text{(II)}$$

(Fleck X) (Fleck Y)

RNase A-Fingerprintanalyse Sekundäranalyse

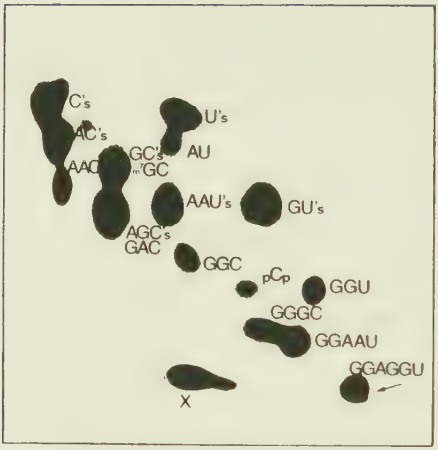


Abb. 22: RNase A-Fingerprint des Fragments D5. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind rechts neben den Flecken angegeben. Der vernetzte Komplex X läuft als etwas verzogener Fleck (vgl. Text).

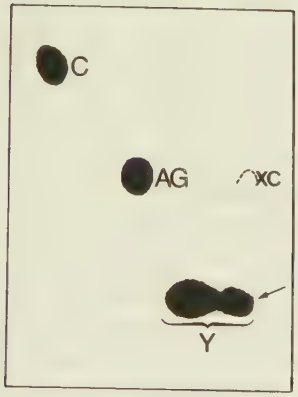


Abb. 23: Sekundäranalyse des Fleckes X des RNase A-Fingerprints. Nach der Hydrolyse des Fleckes mit RNase T_1 waren ein C, ein AG und ein untypischer Fleck Y zu sehen (vgl. Text).

Aus den Reaktionsschemata I und II ergibt sich, daß das Nukleotid G (Pos. 497) des Oligonukleotids AGAAGAAGC (493-501) mit dem Oligonukleotid AAGC (546-549) vernetzt wurde. Eine mögliche Heterogenität der Vernetzungsstelle konnte nicht ausgeschlossen werden, da AAG in den Sekundäranalysen der vernetzten Oligonukleotide der Fragmente D1-4 und D6-7 gefunden wurde (siehe Diskussion).
Eine Tertiäranalyse mit RNase T_2 konnte wegen der geringen Radioaktivität der untypischen Flecken Y nicht durchgeführt werden.

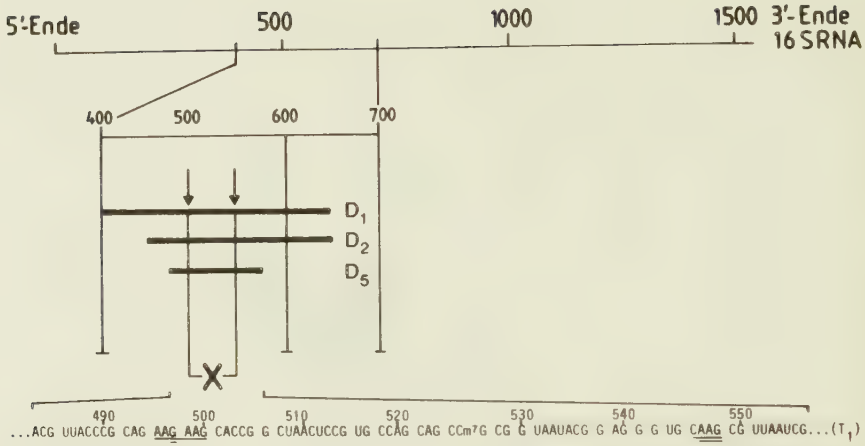


Abb. 24: Lokalisierung der RNA-Bereiche der vernetzten D-Fragmente in der 16S RNA. Die zwei oberen Balken entsprechen den RNA-Bereichen der Fragmente D1 und D2 nach der Hydrolyse mit RNase V_1 der dritte Balken entspricht dem RNA-Bereich des Fragments D5 nach der Hydrolyse mit einer Kombiation von RNase V_1 und RNase H. In der unten detailliert aufgeführten RNA-Sequenz wurde die genaue Vernetzungsstelle doppelt unterstrichen.

Fragment E

Dieses UV-Vernetzungsprodukt wurde nach einer partiellen Hydrolyse mit einer Kombination aus RNase V_1 und RNase H erhalten. Es handelt sich um ein kurzes Fragment (etwa 60 Nukleotide), das in hoher Ausbeute (100.000 cpm) isoliert werden konnte. Im 2D-Gel liegt es unten rechts (vgl. Abb. 10b).

Das 5'-Ende des Fragments konnte einerseits durch das Fehlen der Oligonukleotide pAAAUUG (Pos. 1-6) und AAG (Pos. 7-9) und andererseits durch die Anwesenheit von pAG (Pos. 10-11) im T_1-Fingerprint lokalisiert werden (Abb. 25). Die vier Nukleotide GAAG (Pos. 6-9) könnten mit den komplementären DNA-Sequenzen d-(CTTCCC) gepaart sein und somit eine Erkennungsstelle für die Hydrolyse mit RNase H darstellen. Durch die Anwesenheit eines Flecks links oben im T_1-Fingerprint, der der Zusammensetzung UAA_{OH} entspricht, konnte das 3'-Ende (Pos. 70-72) identifiziert werden. Außerdem existiert in Position 72 eine bereits bekannte V_1-Schnittstelle (Vassilenko et al., 1981).

Nach der Eingrenzung des Bereiches von Fragment E wurden nun die vernetzten Oligonukleotide gesucht. In der T_1-Fingerprintanalyse fehlten die Oligonukleotide AUUG (Pos. 28-31) und CCUAACACAUG (Pos. 47-57), außerdem wurde nach Molaritätsabschätzung nur einmal AACG statt zweimal gefunden. Am Startpunkt trat ein neuer Fleck auf, der mit X bezeichnet wurde (vgl. Abb. 25). Die Sekundäranalyse dieses Flecks nach Hydrolyse mit RNase A ergab C, AC, AAC, je zweimal G, U und AU und einen untypischen Fleck Y (Abb. 26). Auf Grund der Tatsache, daß das Nukleotid G (Pos. 31) nicht hydrolysiert worden war und daß das Nukleotid C nur schwach erschien (vgl. Abb. 26), wurde klar, daß die Vernetzung zwischen dem G des Oligonukleotids AUUG (Pos. 28-31) und einem C (Pos. 47 oder 48) des Oligonukleotids CCUAACACAUG (Pos. 47-57) stattgefunden haben mußte. Dies wird durch folgendes Reaktionsschema noch einmal verdeutlicht:

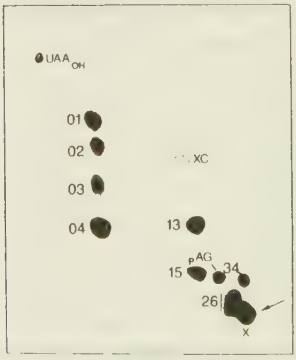
AUUGAACG
CCUAACACAUG

RNase A → AAC+AC+2AU+2U+2G+C+ Fleck Y

(Fleck X)

RNase T_1-Fingerprintanalyse Sekundäranalyse

In der RNase A-Fingerprintanalyse wurden die Oligonukleotide AGGC (Pos. 44-47) und AAC (Pos. 50-52) gefunden. Da das Nukleotid C in der Position 47 Bestandteil des Oligonukleotids AGGC ist, muß das C in der Position 48 der zweite Vernetzungspartner sein. Die Analyse des ersten Vernetzungspartners war im RNase A-Fingerprint nicht eindeutig, da GAAC zweimal gefunden wurde. Eine Tertiäranalyse, die hier eine Klärung hätte bringen können, konnte wegen zu geringer Radioaktivität der Flecken nicht durchgeführt werden.



01	G 4x	13	CUG	26	AUCAUG	34	UUUG
02	CG	15	CUCAG				
03	CAG						
04	CAAG AACG						

5'-Ende : pAG 3'-Ende : UAA_{OH} X : AUUG x CCUAACACAUG

Abb. 25: RNase T_1-Fingerprint des Fragments E. Das 5'-Ende des Fragments wurde durch das Oligonukleotid pAG und das 3'-Ende durch das Oligonukleotid UAA_{OH} identifiziert. Der

Fleck X zeigt das vernetzte Oligonukleotid (vgl. Text).

Tabelle 5: Die nach der Hydrolyse mit RNase T_1 entstandenen Oligonukleotide des Fragments E.

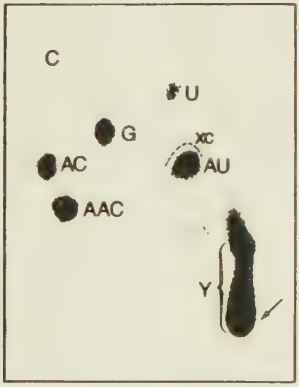


Abb. 26: Sekundäranalyse des vernetzten Flecks X nach Hydrolyse mit RNase A. Der untypische Fleck wurde mit Y bezeichnet (vgl. Text).

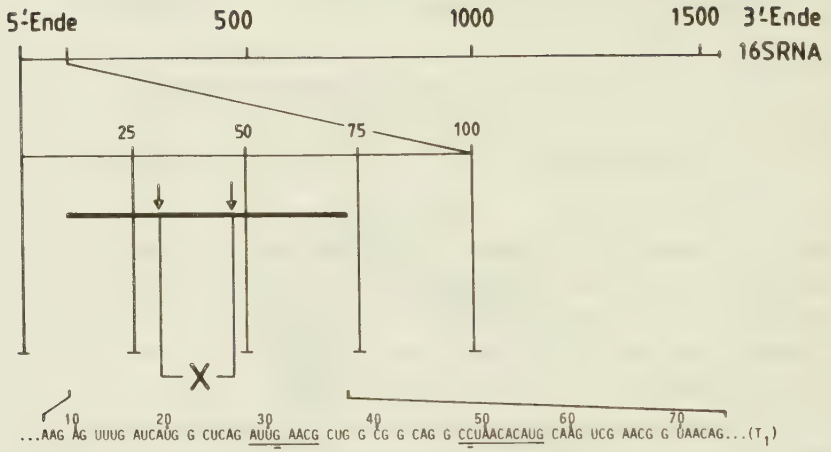


Abb. 27: Lokalisierung des 16S RNA-Bereichs von Fragment E. Zur besseren Identifizierung wurden die Sequenzen (nach Hydrolyse mit RNase T_1) unten aufgeführt. Die vernetzten Oligonukleotide wurden unterstrichen; die präzisen Vernetzungsstellen wurden doppelt unterstrichen.

Fragment F

Dieses UV-vernetzte Fragment wurde, wie das Fragment E, nach einer partiellen Hydrolyse mit einer Kombination aus RNase V_1 und RNase H erhalten. Das in der Abbildung des 2D-Gels (Abb. 28a) gezeigte Fragment stammt aus dem unteren Bereich des eindimensionalen Gels. Es handelt sich hier um ein Fragment mittlerer Größe, das sich aus zwei weit entfernt liegenden Bereichen der 16S RNA zusammensetzt. Die anhand der T_1-Fingerprintanalyse identifizierten Bereiche umfassen jeweils etwa 70 Nukleotide.
Das 5'-Ende des ersten Bereichs ist identisch mit dem Anfangs-

oligonukleotid der 16S RNA, pAAAUUG (Pos. 1-6). Das 3'-Ende liegt wahrscheinlich an der V_1-Schnittstelle in Position 72, da einerseits im RNase A-Fingerprint das Oligonukleotid GGU (Pos. 68-70) gefunden wurde, andererseits im RNase T_1-Fingerprint das Oligonukleotid UAACAG (Pos. 70-75) abwesend war. Außerdem wurde durch Molaritätsabschätzung zweimal AACG (Pos. 32-35 und 65-68) gefunden. Im Gegensatz zu Fragment E konnten alle in diesem Bereich befindlichen Oligonukleotide in der T_1-Fingerprintanalyse gefunden werden.

Durch den Nachweis des Oligonukleotids pAUG (Pos. 1022-1024) im RNase T_1-Fingerprint konnte das 5'-Ende des zweiten Bereichs von Fragment F als eine bereits bekannte V_1-Schnittstelle lokalisiert werden (Pos. 1022, Vassilenko et al., 1981). Durch die Anwesenheit von UUAAG (Pos. 1090-1094) und gleichzeitige Abwesenheit von UCCCG (Pos. 1095-1099) im T_1-Fingerprint und die Anwesenheit von AAGU (Pos. 1092-1095) im A-Fingerprint konnte die Position 1095 als 3'-Ende des zweiten Bereichs identifiziert werden. An diesem 3'-Ende befindet sich möglicherweise auch eine RNase H-Schnittstelle, da GGGUUAAG (Pos. 1087-1094) und die DNA-Sequenz d-(CTTCCC) unter Umgehung der beiden eine Ausstülpung bildenden U-Nukleotide eine Hybridisierung eingehen könnten. Die in diesem zweiten Bereich befindlichen Oligonukleotide konnten ebenfalls alle in der Fingerprintsanalyse gefunden werden. Wie bereits erwähnt, konnten alle in den Fingerprintanalysen erhaltenen Flecke (in Abb. 29 wurde der T_1-Fingerprint dargestellt) der 16S RNA-Sequenz lückenlos zugeordnet werden, so daß weder ein Oligonukleotid fehlte noch ein atypischer Fleck zurückblieb. Dieser außergewöhnliche Befund könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß zwei gleich lange Fragmente zufällig die gleichen Laufeigenschaften im 2D-Gel hatten. Dies konnte jedoch durch eine vergleichende Analyse zweier unvernetzter Flecke (I und II, vgl. Abb. 28a) des 2D-Gels mit Fleck F ausgeschlossen werden. Hierzu wurde die Laufmobilität der Flecken F (144 Nukleotide), I (88 Nukleotide) und II (64 Nukleotide) in der ersten Dimension gegen den Logarithmus der Kettenlänge derselben Flecken aufgetragen. Im Diagramm (vgl. Abb. 28b)

verdeutlicht der Buchstabe M die Position, die Fragment F nach dem Auftragen gegen den Logarithmus einer Kettenlänge von 72 Nukleotiden haben müßte.

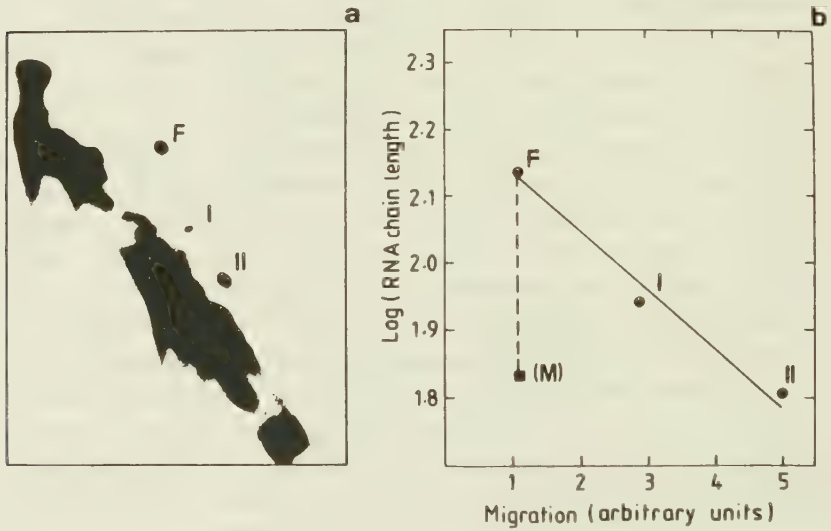
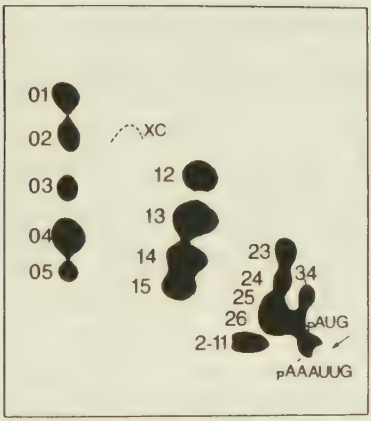


Abb. 28: a. 2D-Gel mit dem vernetzten Fleck F und den unvernetzten Flecken I und II; b. zeigt das Diagramm, in dem die Laufmobilität der Flecken F, I und II gegen den Logarithmus ihrer Kettenlänge aufgetragen wurde. Der Fleck M bezeichnet die Position, die Fragment F bei einer Kettenlänge von 72 Nukleotiden haben müßte (vgl. Text).



01	G 11x	12	UG 4x	23	UUG 2x	34	UUUG
02	AG 2x CG	13	CUG 3x UCG 2x	24	AUUG		
				25	UUAAG		
03	AAG CAG	14	CAUG CUCG UCAG	26	AUCAUG CCUUCG		
04	AACG 2x ACAG CAAG	15	AAAUG CUCAG	2-11	CCUAACACAUG		
05	AACCG						

5'-Ende-(1.Fragment) : pAAAUUG 5'-Ende-(2.Fragment) : pAUG

Abb. 29: T_1-Fingerprint des Fragments F.

Tabelle 6: Die nach Total-Hydrolyse mit RNase T_1 entstandenen Oligonukleotide des Fragments F.

Da weder in der RNase T_1- noch in der RNase A-Fingerprintanalyse die Vernetzungsstelle eindeutig identifiziert werden konnte, muß angenommen werden, daß die Vernetzung nicht innerhalb charakteristischer Bereiche, sondern zwischen einzelnen Nukleotiden oder kurzen Oligonukleotiden stattgefunden hat. Die Abwesenheit kürzerer Oligonukleotide ist wegen ihrer ungünstigen Molaritätsverhältnisse im Fingerprintsystem jedoch schwer zu bestimmen.
Aufgrund der Auswertung der RNase T_1- und RNase A-Fingerprintanalysen von Fragment F und den sich daraus ergebenden Überlappungen der einzelnen Oligonukleotide könnte man beispielsweise die RNA-Sequenzen 36-42 und 1058-1064 als uncharakteristische Bereiche bezeichnen und für eine Vernetzung in Betracht ziehen.

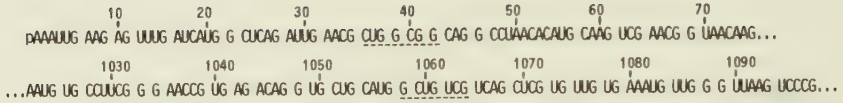

10 20 30 40 50 60 70
pAAAUUG AAG AG UUUG AUCAUG G CUCAG AUUG AACG CUG G CG G CAG G CCUAACACAUG CAAG UCG AACG G UAACAAG...
1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090
...AAUG UG CCUUCG G G AACCG UG AG ACAG G UG CUG CAUG G CUG UCG UCAG CUCG UG UUG UG AAAUG UUG G G UUAAG UCCCG...

Abb. 30: Lokalisierung der beiden RNA-Bereiche (1-72 und 1022-1095) des vernetzten Fragments F. Die möglicherweise für eine Vernetzung in Frage kommenden uncharakteristischen Bereiche sind hier unterstrichen (vgl. Text).

5.1.2. Quervernetzungsreaktion mit N-Lost als Reagenz innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten

Mit dem Vernetzungsreagenz Bis-(2-chlorethyl)-amin wurde versucht, die 16S- und die 23S RNA innerhalb der intakten 70S Ribosomen zu verknüpfen (Zwieb et al., 1978). Quervernetzungen zwischen RNA und Protein konnten ebenfalls damit induziert werden (Ulmer et al., 1978). Mit der methylierten Verbindung dieses Reagenzes Bis-(2-chlorethyl)-methylamin /N-Lost konnte Stiege (1982) bei seinen Experimenten zeigen, daß das methylierte Derivat viel reaktiver ist und bei der Reaktion mit 50S ribosomalen Untereinheiten bereits bei dreifach geringerer Konzentration zu einer Reihe von Quervernetzungen in der 5S- und 23S RNA führt.
N-Lost wurde in dieser Arbeit sowohl für die Vernetzungsreaktion innerhalb der 30S Untereinheiten als auch für die Vernetzungsreaktion der 16S- und 23S RNA in 70S Ribosomen verwendet.

5.1.2.1. Isolierung der durch N-Lost vernetzten 16S RNA-Fragmente

Für die Vernetzungsreaktion mit N-Lost wurden, wie bei der UV-Vernetzung, 30S ribosomale Untereinheiten verwendet, deren RNA mit ^{32}P markiert worden war. Diese 30S Untereinheiten wurden mit dem Vernetzungsreagenz in einer Konzentration von 1 mM behandelt (vgl. 4.4.1.2.). Nachdem die Reaktion durch Zugabe von Cysteaminchlorid beendet worden war, wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Daran schloß sich die Hydrolyse der RNA innerhalb der 30S Untereinheiten mit RNase V_1 (vgl. 4.5.1.) an; in einigen Fällen wurde außerdem eine zweite partielle Hydrolyse mit RNase H (vgl. 4.5.3.) vorgenommen. Die Trennung der hydrolysierten vernetzten RNA Fragmente erfolgte in einem zweidimensionalen Gelsystem, wie in 4.6.1.2. bereits beschrieben wurde. Die vernetzten Flecke oberhalb der Diagonale wurden mit den Großbuchstaben G, H und I bezeichnet (vgl. Abb. 32a und 33a). In einem Kontrollexperiment wurden unbehandelte, durch RNase V_1 hydrolysierte 30S Untereinheiten ebenfalls in einem 2D-Gelsystem getrennt (vgl. Abb. 32b und 33b).

Abb. 31: 1D-gelelektrophoretische Trennung der 16S RNA nach RNase V_1-Hydrolyse in einem 3 - 15% PAA-Gradientengel. a. mit N-Lost vernetzte 16S RNA; b. nicht vernetzte 16S RNA (als Kontrolle). Die Elektrophorese-Richtung war von oben nach unten. XC zeigt die Laufposition des mitaufgetragenen Xylencyanol als Farbmarker.

Abb. 32: Trennung der ^{32}P markierten, mit N-Lost vernetzten, durch RNase V_1 hydrolysierten RNA Fragmente in einem zweidimensionalen Gelsystem. a: 2D-Trennung des oberen Teils eines 1D-Gelstreifens. Das N-Lost-vernetzte Fragment G stammt aus diesem 2D-Gel (vgl. Text). b: 2D-Trennung der unbehandelten Probe nach einer partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 (als Kontrolle).

Abb. 33: Trennung der ^{32}P markierten, mit N-Lost vernetzten Fragmente in einem zweidimensionalen Gelsystem. a: 2D-Trennung des unteren Teils eines 1D-Gelstreifens, die vernetzten Flecke wurden mit H und I bezeichnet. b: 2D-Trennung der unbehandelten Probe nach einer partiellen Hydrolyse mit RNAse V_1 (als Kontrolle).

5.1.2.2. Analyse der durch N-Lost vernetzten 16S RNA Fragmente

Fragment G

Dieses durch Reaktion mit N-Lost vernetzte Fragment wurde nach einer Kombination der partiellen Hydrolysen mit RNase V_1 und RNase H erhalten; es stammte aus dem oberen Bereich des eindimensionalen Gels (vgl. Abb. 32a). Aus der RNase T_1-Fingerprintanalyse konnte geschlossen werden, daß sich dieses

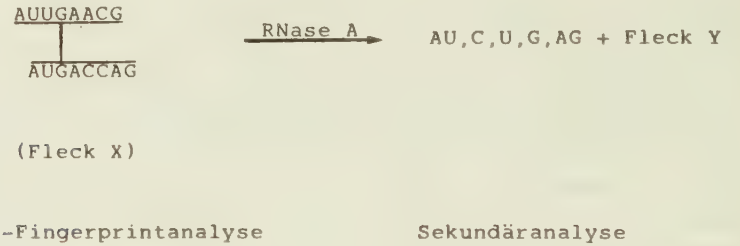
Fragment aus zwei verschiedenen Bereichen der 16S RNA, die etwa 150 Nukleotide voneinander entfernt liegen, zusammensetzt. Der erste Bereich von Fragment G ist praktisch identisch mit dem des Fragments F, das durch UV-Bestrahlung erhalten wurde (vgl. 5.1.1.2.). Das 5'-Ende des ersten Bereichs konnte durch die Anwesenheit des Oligonukleotids pAAAUUG (Pos. 1-6) im RNase T_1-Fingerprint lokalisert werden (vgl. Abb. 34). Durch die Abwesenheit des Oligonukleotids UAACAG (Pos. 70-75) im RNase T_1-Fingerprint konnte vermutet werden, daß das 3'-Ende dieses Bereiches auch hier wieder an der bekannten V_1-Schnittstelle in Position 72 liegt.

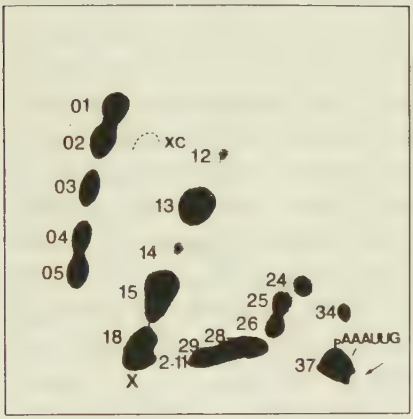
Der zweite Teil des Fragments G ist etwa 120 Nukleotide lang. Charakteristisch für diesen Bereich ist das Oligonukleotid CUCACCUAG mit der Klassifizierung 29 (siehe Abb. 34) in der Position 267-275, von dem ein U-Nukleotid (Pos. 268 oder 273) heterogen ist und durch eine Transition gegen das Nukleotid C ausgetauscht werden kann (Carbon et al., 1979).
Durch das Fehlen des Oligonukleotids ACCUUCG (Pos. 205-211) und die Anwesenheit von CCUCUUG (Pos. 214-220) im RNase T_1-Fingerprint konnte die ungefähre Position des 5'-Endes des zweiten Bereichs zunächst eingegrenzt werden. Genau lokalisiert werden konnte das 5'-Ende in Position 214 dann anhand des fehlenden Oligonukleotids AAAGAGGGGGAC (Pos. 195-206) und der Anwesenheit von GGGC (Pos. 211-214) im RNase A-Fingerprint. Das 3'-Ende des zweiten Bereichs konnte anhand der Auswertung des RNase T_1-Fingerprints (Anwesenheit von UCCAG (Pos. 333-337) und Abwesenheit von ACUCCUACG (Pos. 338-346) mit Position 337 angegeben werden. Das 3'-Ende stimmt gut mit der bereits bekannten V_1-Schnittstelle in dieser Position überein (Vassilenko et al., 1981).
Die Vernetzung wurde dadurch gezeigt, daß innerhalb des ersten Bereichs eindeutig das Oligonukleotid AUUG (Pos. 28-31) im T_1-Fingerprint fehlte, während innerhalb des zweiten Bereichs AUG (303-305) und ACCAG (306-310) nicht vorhanden waren. Das vor AUUG (Pos. 28-31) liegende Oligonukleotid CUCAG (Pos. 23-27) war anwesend, während von dem nachfolgenden AACG nach

Molaritätsabschätzung zu wenig gefunden wurde. Wegen der G-Spezifität von N-Lost (vgl. Reaktionsschema des N-Lost) lag es nahe, daß das G des Oligonukleotids AUUG (Pos. 28-31) eine der Vernetzungskomponenten ist.
Durch die Anwesenheit sowohl des Oligonukleotids GAGAGGAU (Pos. 297-304) in der RNase A -Fingerprintanalyse als auch von CCACACUG (311-318) im RNase T_1 -Fingerprint konnte das Nukleotid G-305 als die Vernetzungskomponente aus dem zweiten Bereich identifiziert werden. Als zweite mögliche Vernetzungskomponente wurde das dem G-305 benachbarte Nukleotid A(306) identifiziert, da eine Heterogenität der Vernetzungsstelle in diesem Bereich gefunden wurde (vgl. Diskussion).

Die Sekundäranalyse des im T_1-Fingerprint aufgetretenen Flecks X ergab nach Hydrolyse mit RNase A: AU, AG, G, C, U und einen untypischen Fleck Y (vgl. Abb. 35).

Es liegt nahe, daß der Fleck Y das vernetzte Oligonukleotid enthalten muß, wie aus dem Reaktionsschema ersichtlich ist:





01	G	14x	12	UG	2x	24	UCUG	34	UUUG
02	AG	4x	13	AUG	2x	25	AUUAG	37	CCUCUUG
	CG	2x		CUG	2x				
03	ACG			UCG		26	AUCAUG		
	CAG			UAG					
						28	AUCCCUAG		
			14	CUAG					
04	AACG	2x				29	CUCACCUAG		
	CAAG		15	AACUG					
				CUCAG		2-11	CCUAACACAUG		
05	ACACG			UCCAG					
	CCCAG			UAACG					
			16	CCAUCG					
			18	CCACACUG					

5'-Ende-(1.Fragment) : pAAAUUG X : AUUGAACG x AUGACCAG

Abb. 34: T_1-Fingerprint des N-Lost-vernetzten Fragents G. Das 5'-Ende des ersten Bereichs wurde durch einen Fleck pAAAUUG direkt über dem Startfleck identifiziert. Das vernetzte Oligonukleotid wird durch den Fleck X gezeigt (vgl. Text).

Tabelle 7: Die nach Hydrolyse mit RNase T_1 entstandenen Oligonukleotide des Fragments G.

Abb. 35: Sekundäranalyse des vernetzten Flecks X nach der Hydrolyse mit RNase A. Der Fleck Y enthält das Vernetzungsprodukt (vgl. Text).

Die in der Sekundäranalyse weit links liegende Laufposition des Flecks Y wird von den zwei durch die Reaktion mit N-Lost entstandenen positiven Ladungen am N-7 der beiden vernetzten Guanosin-Nukleotide verursacht.
Der Fleck Y konnte wegen zu geringer Radioaktivität nicht weiter mit RNase T_2 zur Tertiäranalyse hydrolysiert werden.
In anderen Experimenten wurden heterogene Vernetzungsstellen festgestellt; am 5'-Teil reagierten neben dem bereits erwähnten G-31 auch G-46 und G-57 mit dem G-305. Im 3'-Teil wurde ebenfalls eine heterogene Vernetzungsstelle gefunden, hier wurden anstelle des G-305 auch die G-Nukleotide in den Positonen 293 bis 297 als vernetzte Nukleotide festgestellt.

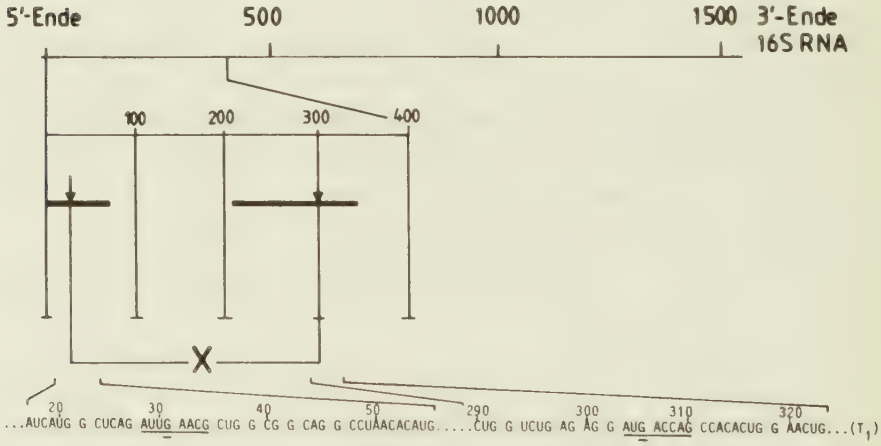


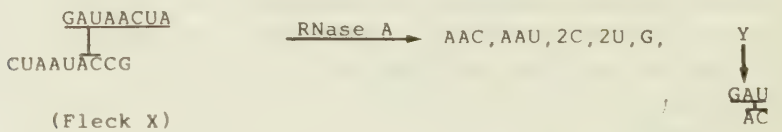
Abb. 36: Lokalisierung der RNA-Bereiche des durch N-Lost vernetzten Fragments G. Die vernetzten Nukleotide wurden doppelt unterstrichen.

Fragment H:

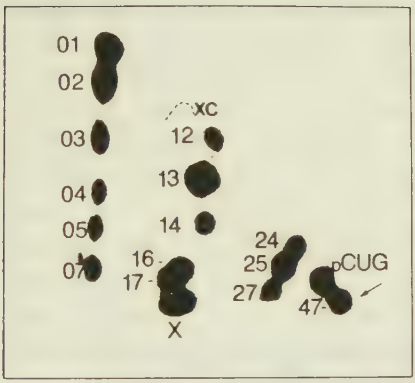
Dieses Fragment ging aus verschiedenen Experimenten in jeweils unterschiedlicher Länge hervor. Es wurde sowohl aus einem "normalen" als auch aus einem "langen" gelelektrophoretischen Lauf (vgl. 4.6.1.1.) gewonnen. Alle diese Varianten von Fragment H wiesen die gleiche Vernetzungsstelle auf. Stellvertretend soll hier nur das kürzeste der analysierten H-Fragmente beschrieben werden.
Es ist etwa 120 Nukleotide lang und wurde nach einer partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 und der sich anschließenden zweidimensionalen Trennung extrahiert und in einem denaturierenden Gel nachgereinigt (vgl. 4.6.2.). Das 5'-Ende des Fragments konnte anhand der Auswertung des RNase T_1-Fingerprints (Abwesenheit von CUUG (Pos. 83-86) und den links davon liegenden Oligonukleotiden, Anwesenheit von CUUUG (Pos. 90-94)) identifiziert werden. Die Lage des 5'-Endes stimmte gut mit der bereits bekannten V_1-Schnittstelle in der Position 89 überein (Vassilenko et al., 1981). Durch das Vorhandensein von ACCUUCG (205-211) und das Fehlen von CCUCUUG (214-220) konnte das 3'-Ende lokalisiert werden. Fragment H wird charakterisiert durch das Oligonukleotid CAUAACG (178-184) mit der Klassifizierung 17, dessen Nukleotid C-183 heterogen ist und durch Transition gegen ein U ausgetauscht werden kann (Carbon et al., 1979).
Die Vernetzungsstelle wurde durch das Fehlen der Oligonukleotide AUAACUACUG (Pos. 149-158) und CUAAUACCG (Pos. 169-177) im RNase T_1-Fingerprint gezeigt; außerdem trat ein neuer Fleck X auf. Durch die Anwesenheit der CUAAUACCG benachbarten Oligonukleotide UAG (Pos. 166-168) und CAUAACG (Pos. 178-184) wurde klar, daß G-168 und G-177 nicht als Vernetzungskomponente in Frage kamen.
Die Sekundäranalyse des Flecks X nach Hydrolyse mit RNase A ergab AAC, AAU, 2C, 2U und G mit den entsprechenden relativen Phosphat-Intensitäten und einen unhydrolysierten Fleck Y. AAU, 2C, G und U mußten aus dem Oligonukleotid CUAAUACCG

(Pos. 169-177) stammen, denn es existiert im ganzen Bereich des Fragments H nur ein Oligonukleotid mit dieser Zusammensetzung. Wie bereits erwähnt, konnte das Nukleotid G-177 als Vernetzungskomponente ausgeschlossen werden, so daß nur noch AC (Pos. 174/175) von dem Oligonukleotid CUAAUACCG als Vernetzungspartner in Frage kam. Innerhalb des anderen fehlenden Oligonukleotids AUAACUACUG (Pos. 149-158) ist eine bekannte V_1-Schnittstelle in der Position 155 vorhanden (Vassilenko et al., 1981). Im RNase T_1-Fingerprint konnte ein Fleck, der dem Oligonukleotid pCUG entspricht, identifiziert werden. Dieses pCUG stellt das V_1-Schnittprodukt des Oligonukleotids AUAACUACUG dar. Da AUAACUA (149-155) abwesend war, wurde die Vernetzungsstelle in diesem Oligonukleotid vermutet. AAC und U wurden, wie bereits erwähnt, in der Sekundäranalyse gefunden; damit scheiden sie als Vernetzungskomponente aus. Da pCUG (156-158) im RNase T_1-Fingerprint gefunden wurde, war es unwahrscheinlich, daß das Nukleotid A-155 an der Vernetzung beteiligt ist. Da aber AU (149-150) abwesend ist, könnte das Nukleotid G-148 eine der Vernetzungskomponenten sein. Einzelne Nukleotide sind im Fingerprintsystem aufgrund ihrer ungünstigen Molaritätsverhältnisse jedoch schwer zu bestimmen.

Bislang wurde angenommen, daß die durch N-Lost induzierten Vernetzungen, beispielsweise in der 23S RNA, nur zwischen den Basen G-G stattgefunden haben (Stiege et al., 1982). Bei Fragment H handelt es sich dagegen um eine Verknüpfung zwischen den Basen A und G (siehe auch 6.3).
Das Reaktionsschema soll dies noch einmal verdeutlichen:



Die Durchführung einer Tertiäranalyse des Flecks Y war wegen der geringen Radioaktivität nicht möglich.



01	G 10x	12	UG 2x	24	UCUG	47	CUGCUUUG
02	AG 3x CG	13	AUG UAG UCG CUG	25	UAAUG		
03	ACG 2x			27	ACCUUCG		
04	CAAG	14	CCUG				
05	AAACG	16	AAACUG				
07	ACCAAAG	17	CAUAACG				

X : GAUAACUA x CUAAUACCG

Abb. 37: Autoradiographie des T_1-Fingerprints von Fragment H. Der Fleck mit dem vernetzten Oligonukleotid wurde mit X bezeichnet (vgl. Text).

Tabelle 8: Die nach der Hydrolyse mit RNase T_1 entstandenen Oligonukleotide des Fragments H.

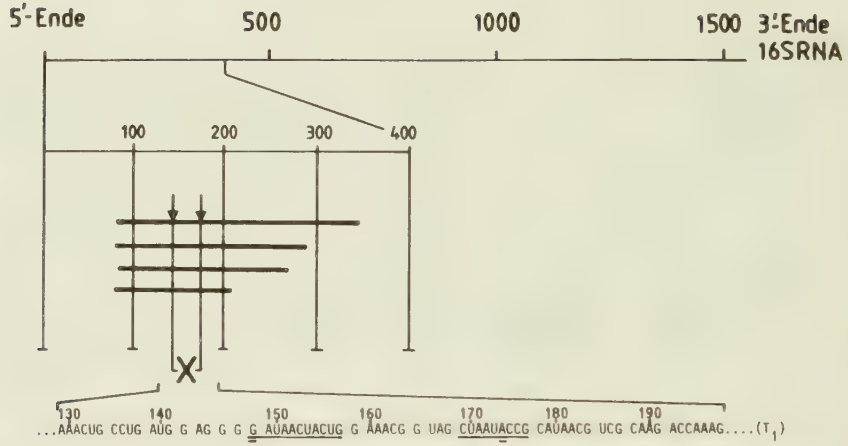


Abb. 38: Lokalisierung des durch N-Lost vernetzten Fragments H. Die miteinander vernetzten Nukleotide sind doppelt unterstrichen (vgl. Text).

Fragment I

Dieses Fragment stammt, ebenso wie Fragent H, aus dem unteren Teil des eindimensionalen Gelstreifens. Anhand der Laufposition des Flecks von Fragment I nach der zweidimensionalen Trennung ließ sich abschätzen, daß es aus etwa 130 Nukleotiden zusammengesetzt sein muß. Es wird charakterisiert durch das Oligonukleotid $Am^6_2Am^6_2CCUG$ (Pos. 1518-1523) mit der Klassifizierung 16 (Uchida, et al., 1974). Dieses Oligonukleotid enthält zwei der insgesamt neun methylierten Basen in der 16S RNA (Carbon et al., 1979).

Das 3'-Ende dieses Fragments konnte durch die Anwesenheit des Oligonukleotids $AUCACCUCCUUA_{OH}$ (Pos. 1531-1542) identifiziert werden. Dieses letzte Oligonukleotid der 16S RNA wurde als ein Fleck zwischen denen der Reihe mit einem U und denen der Reihe mit zwei U-Nukleotiden im RNase T_1-Fingerprint sichtbar (vgl. Abb. 39).

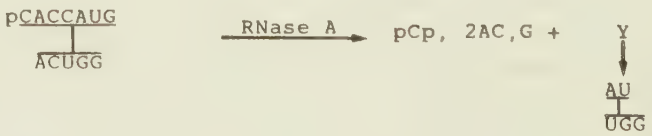
Aus dem Fehlen der Oligonukleotide CCUUG (Klassifizierung 25; Position 1388-1392), UACACACCG (Klassifizierung 19; 1393-1401) und m^4CCCG (Klassifizierung 04; 1402-1405) läßt schließen, daß das 5'-Ende nicht vor Position 1406 anzusiedeln ist. Es wird innerhalb des Oligonukleotids $Um^5CACACCAUG$ (Klassifizierung 2-10; Pos. 1406- 1415) vermutet.

Die Abwesenheit des Oligonukleotids ACUG (1483-1486) mit der Klassifizierung 14 im RNase T_1-Fingerprint lieferte einen Hinweis auf einen der Vernetzungspartner am 3'-Ende Bereich (vgl. Abb. 39). Dieses Oligonukleotid kommt im Bereich von Fragment I nur einmal vor. Die im RNase A-Fingerprint benachbart liegenden Oligonukleotide GAC (1482-1484) und GAAGU (1491-1495) wurden gefunden, während GGGGU (1486-1490) nicht vorhanden war. Das bedeutet, daß sich das im RNase T_1-Fingerprint fehlende Oligonukleotid ACUG (Pos. 1483-1486) mit dem im RNase A-Fingerprint fehlenden GGGGU (1486-1490) in der Position 1486 überlappt. Somit ist eindeutig bewiesen, daß das Nukleotid G-1486 der eine Vernetzungspartner ist.

Die Sekundäranalyse des Flecks X vom RNase T_1-Fingerprint ergab nach Hydrolyse mit RNase A einen Fleck, der dem V_1-Schnittprodukt pCp entspricht; außerdem AC, C, G (in den relativen Phosphat-Intensitäten 4:1:1) und einem untypischen Fleck Y. Durch das Vorhandensein des V_1-Schnittprodukts pCp läßt sich das 5'-Ende von Fragment I genauer lokalisieren. Es liegt an der bekannten V_1-Schnittstelle in der Position 1408 (Vassilenko et al., 1981).

Alle T_1-Oligonukleotide innerhalb dieses Fragmentes bis auf ACUG (1483-1486) konnten gefunden werden. Das deutet darauf hin, daß die zweite Vernetzungskomponente innerhalb der anderen Hälfte des bereits erwähnten Oligonukleotids 1406-1415 liegen muß. Die Anwesenheit von pCp, 2AC, C und G unterstützt diese Annahme. Während die zwei AC-Oligonukleotide aus der Position 1410/1411 und 1483/1484 stammen, läßt sich das Nukleotid C der Position 1412 zuordnen.

Da das Oligonukleotid AU (1413/1414) in der Sekundäranalyse nicht gefunden wurde, muß dessen Nukleotid A vernetzt sein, so daß das noch verbliebene G-Nukleotid zu Position 1415 gehören muß.
Die Sekundäranalyse des Flecks X soll noch einmal durch ein Reaktionsschema verdeutlicht werden:

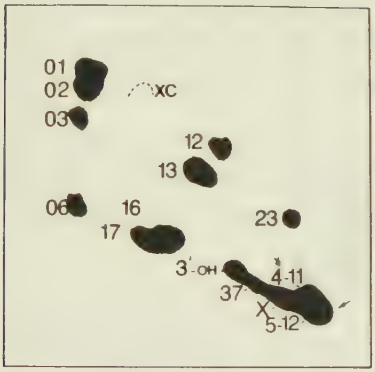


(Fleck X)

RNase T_1-Fingerprintanalyse Sekundäranalyse

Der in der Sekundäranalyse erhaltene Fleck Y konnte wegen zu geringer Radioaktivität keiner Tertiäranalyse unterzogen werden. Bei dem Vernetzungsprodukt von Fragment I handelt es sich

um eine A-G Verknüpfung, die auch schon bei Fragment H beobachtet wurde.



01	G 18x	12	UG 3x	23	UUG 2x	37	AUUCAUG
02	AG 2x CG	13	UAG UCG			4-11	CUUAACCUUCG
03	AAG 2x	16	UAACCG $m^6_2Am^6_2ACCUG$				
06	CAAAAG					5-12	CUUACCACUUUG
		17	mUAACAAG				

3'-Ende : $AUCACCUCCUUA_{OH}$ X : ACCAUG x ACUG

Abb. 39: T_1-Fingerprint des mit N-Lost vernetzten Fragments I. Das Endoligonukleotid dieses Fragments ist gleichzeitig das letzte Oligonukleotid der 16S RNA (Pos. 1531-1542) und tritt als ein Fleck zwischen denen der Reihe mit einem U und der Reihe mit zwei U auf (vgl. Text).

Tabelle 9: Die nach der Hydrolyse mit RNase T_1 entstandenen Oligonukleotide des Fragments I.

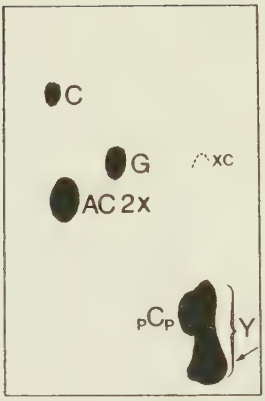


Abb. 39a : Sekundäranalyse des vernetzten Fleckes X (vgl. Text)

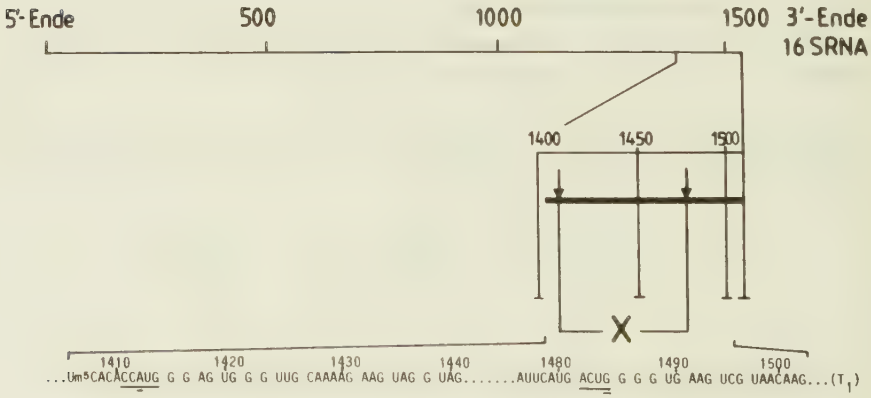


Abb. 40: Lokalisierung des N-Lost vernetzten Fragments I. Die vernetzten Nukleotide wurden doppelt unterstrichen.

5.2. Quervernetzungsreaktionen innerhalb der 70S Ribosomen mit N-Lost als Reagenz

Versuche zur Strukturaufklärung der räumlichen Anordnung an den Berührungspunkten der ribosomalen Untereinheiten wurden mit Hilfe von Quervernetzungsreaktionen durch Bis-(2-chlorethyl)-amin auf der RNA-Ebene von Zwieb et al. (1978) durchgeführt.
Das bifunktionelle Reagenz Phenyldiglyoxal (PDG) wurde ebenfalls für die Vernetzungsreaktionen an der Grenzfläche der ribosomalen Untereinheiten eingesetzt (Chiam et al., 1983).

Am Beginn der Experimente zu dieser Arbeit wurde versucht, die Verknüpfung der 16S und der 23S RNA mit Bis-(2-chlorethyl)methylamin/N-Lost als Reagenz durchzuführen. Dafür werden Ribosomen benötigt, deren RNAs durchgehend mit ^{32}P markiert sind. Die markierten 70S Ribosomen wurden mit N-Lost in einer Endkonzentration von 3 mM behandelt (vgl. 4.4.1.1.).
Anhand der nachfolgend beschriebenen Analysen konnte zwar festgestellt werden, daß 16S-23S RNA Vernetzungen durch N-Lost induziert worden sind, die genaue Vernetzungsstelle konnte aber nicht lokalisiert werden. Statt dessen gelang es, eine Vernetzung innerhalb der 50S ribosomalen Untereinheiten zu identifizieren (vgl. 5.2.2.).

5.2.1. Nachweis der durch N-Lost induzierten Vernetzungen innerhalb der 50S Ribosomen

Nach der Vernetzungsreaktion wurden die 70S Ribosomen durch eine Saccharosegradientenzentrifugation getrennt (vgl. 4.2.3.). Anschließend wurde ein Trennungsprofil angefertigt (vgl. Abb. 41).

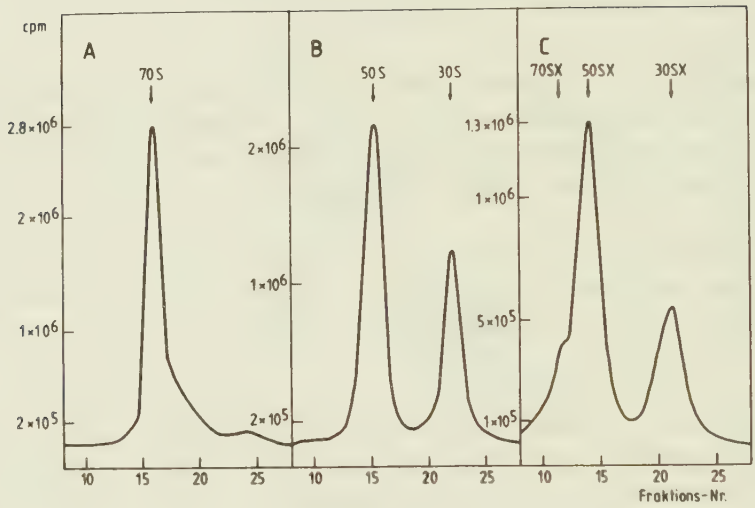


Abb. 41: Trennungsprofile der ^{32}P-markierten 70S Ribosomen nach der Zentrifugation durch einen 10 - 40%igen Saccharosegradienten (vgl. auch 4.2.2. und 4.2.3.). Auf der Abszisse wurden die cpm und auf der Ordinate die Anzahl der Fraktionen aufgetragen. A: Charakteristisches Profil der 70S Ribosomen. B: Trennung der unvernetzten 70S Ribosomen in ihre Untereinheiten unter Dissoziationsbedingungen (Kontrollversuch). C: Trennung der N-Lost vernetzten 70S Ribosomen unter Dissoziationsbedingungen

Wie in Abb. 41C zu sehen ist, wird nach der Trennung ein 70S Gipfel neben dem 50S- und 30S Gipfel sichtbar. Der 70S Gipfel zeigt, daß Vernetzungen zwischen der 16S- und 23S RNA stattgefunden haben. Es konnte aber nicht genau festgestellt werden, ob es sich hier lediglich um RNA-RNA Vernetzungen handelt oder ob daneben auch RNA-Protein und Protein-Protein-Verknüpfungen entstanden sind.

Nachdem die einzelnen Fraktionen der vernetzten Proben gesammelt worden waren, wurden nun Aliquots davon auf einem 2 1/2 - 7 1/2% SDS/EDTA-Gradientengel (vgl. auch 4.6.1.3.) analysiert. Die vernetzten 16S- und 23S RNA Moleküle wurden als sog. "29S" Bande im PAA-Gradientengel oberhalb der 23S RNA-Bande sichtbar. Unterhalb lagen die Banden der 16S- und 5S RNA (vgl. Abb. 42b).

Abb. 42: Gelelektrophoretische Trennung zur Analyse der vernetzten 16S-23S RNA. Zur Kontrolle wurde eine unvernetzte Probe mitaufgetragen (Spalte a). BPB zeigt die Laufposition des mitaufgetragenen Bromphenolblau als Farbmarker.

Anschließend wurde eine Molekulargewichtsbestimmung des vernetzten 16S-23S Komplexes durchgeführt. Dazu wurden die Proben auf einem linearen nicht- denaturierenden 3%igen SDS/EDTA-Gel in die einzelnen Banden (29S, 23S, 16S und 5S RNA) aufgetrennt (vgl. Abb. 43). Die Laufmobilität der 23S und 16S RNA-Flecken

im Gel (I bzw. II) wurde gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Anhand des Verlaufs der Geraden konnte das Molekulargewicht des vernetzten Komplexes (X) ermittelt werden (vgl. Abb. 44). Daraus läßt sich ableiten, daß die vernetzte "29S" RNA aus etwa 4500 Nukleotiden mit einem Molekulargewicht von ca. 1,5 x 10^6 besteht.

Abb. 43: Gelelektrophoretische Trennung des vernetzten 16S-23S RNA-Komplxes auf einem 3%igen SDS/EDTA-Gel zur Molekulargewichtsbestimmung.

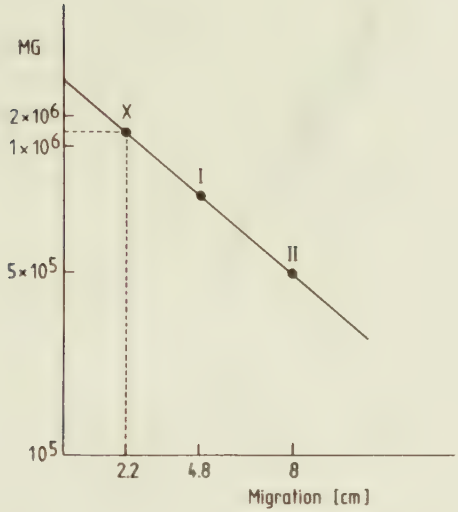


Abb. 44: Diagramm zur Bestimmung des Molekulargewichts der vernetzten 16S-23S-RNA. I : 23S RNA; II : 16S RNA

Die gesammelten Fraktionen der vernetzten 70S Ribosomen und der Untereinheiten wurden mit Ethanol gefällt und anschließend mit RNase V_1 partiell hydrolysiert (vgl. 4.5.4.). Daran schloß sich eine zweidimensionale Trennung an.
Das nachfolgend beschriebene Fragment J stammt aus der zweidimensionalen gelelektrophoretischen Trennung der vernetzten 50S ribosomalen Untereinheiten (vgl. Abb. 45).

Abb. 45: 2D-Gelbild aus dem unteren Teil des eindimensionalen Gelstreifens der vernetzten 50S Untereinheiten nach der partiellen Hydrolyse mit RNase V_1

5.2.2. Analyse des durch N-Lost vernetzten 23S RNA-Fragments

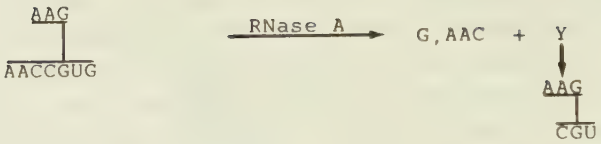
Fragment J

Dieses durch N-Lost vernetzte Fragment ist etwa 130 Nukleotide lang und erscheint im 2D-Gel als ein sauberer Fleck mit ausreichender Radioaktivität. Es wurde davon sowohl ein RNase T_1- als auch ein RNase A-Fingerprint angefertigt.
Durch die Anwesenheit des Oligonukleotids $CUUAACCUU_{OH}$ (Pos. 2896-2904) konnte das 3'-Ende dieses Fragments identifiziert werden. Dieses letzte Oligonukleotid der 23S RNA wanderte als ein Fleck zwischen denen der Reihe mit einem U und denen der Reihe mit zwei U im RNase T_1-Fingerprint (vgl. Abb. 46).

Durch die Abwesenheit von UUCUCCCUG (Pos. 2783-2791) und den links davon liegenden Oligonukleotiden sowie durch das Vorhandensein von pCUUUAAG (Pos. 2795-2801)im RNase T_1-Fingerprint konnte das 5'-Ende lokalisiert werden. Das 5'-Ende stimmte gut mit der bereits bekannten V_1-Schnittstelle (Pos. 2794) innerhalb des Oligonukleotids ACCCUUUAAG überein (Branlant et al., 1981). Dieses ACCCUUUAAG (Pos. 2792-2801) ist charakterisiert durch die heterogenen Nukleotide C (2794), U(2797), U (2796) und A (2799), die gegen U, C, C und G austauschbar sind (Branlant et al., 1981).

Durch das Fehlen des Oligonukleotids AACCG (Pos. 2886-2890) und die Anwesenheit von UACUAAUG (Pos. 2878-2885) im RNase T_1-Fingerprint konnte der eine Vernetzungspartner als G-2890 identifiziert werden. Das Nukleotid A-2886 konnte nicht vernetzt sein, da das bereits erwähnte Oligonukleotid UACUAAUG vorhanden war. Der Nachweis der anderen Vernetzungskomponente gestaltete sich etwas schwieriger. Innerhalb des Bereichs von Fragment J sind neben zweimal AAG noch weitere fünf Oligonukleotide mit der Klassifizierung 03 vorhanden. Anhand einer Molaritätsabschätzung wurde vermutet, daß von denen ein Oligonukleotid fehlte. Das fehlende Oligonukleotid konnte jedoch nicht genau identifiziert werden. Erst die Abwesenheit des Oligonukleotids GAAGGAAC (Pos. 2808-2815) im RNase A-Fingerprint erlaubte eine genauere Eingrenzung. Das Nukleotid G-2808 konnte nicht vernetzt sein, da UCCUG (2804-2808) im RNase T_1-Fingerprint anwesend war. Ebenfalls schied G-2812 aus, da AACG (2813-2816) im RNase T_1-Fingerprint vorhanden war. Bei dem nach Molaritätsabschätzung im RNase T_1-Fingerprint fehlenden Oligonukleotid mit der Klassifizierung 03 mußte es sich also um AAG (Pos. 2809-2811) handeln, das sich mit dem im RNase A-Fingerprint fehlenden GAAGGAAC überlappt. Bei der zweiten Vernetzungskomponente handelt es sich also um das Nukleotid G-2811. Das vernetzte Oligonukleotid besteht aus AAG x AACCG. Die Sekundäranalyse des im RNase T_1-Fingerprint aufgetretenen Flecks X nach Hydrolyse mit RNAse A ergab G, AAC und einen untypischen Fleck Y.

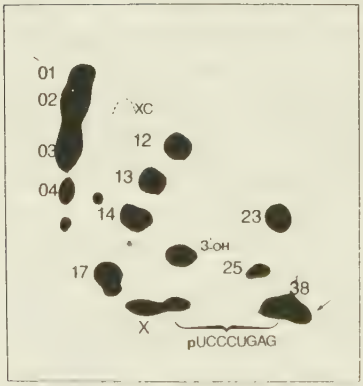
Das Reaktionsschema soll dies noch einmal verdeutlichen:



(Fleck X)

RNase T_1-Fingerprintanalyse

Sekundäranalyse



01	G 8x	12	UG 2x	23	UUG 3x	38	UACUAAUG
02	AG 2x CG 2x	13	AUG	25	UCCUG		
		14	AUAG				
03	AAG ACG 3x CAG CCG		UAAG CUAACCG				
04	AACG						

3'-Ende : $CUUAACCUU_{OH}$ X : AAG x AACCG

Abb. 46: T_1-Fingerprintautoradiographie des Fragments J. Der Fleck X zeigt das vernetzte Oligonukleotid (vgl. Text).

Tabelle 10: Die nach der Hydrolyse mit RNase T_1 entstandenen Oligonukleotide des Fragments J.

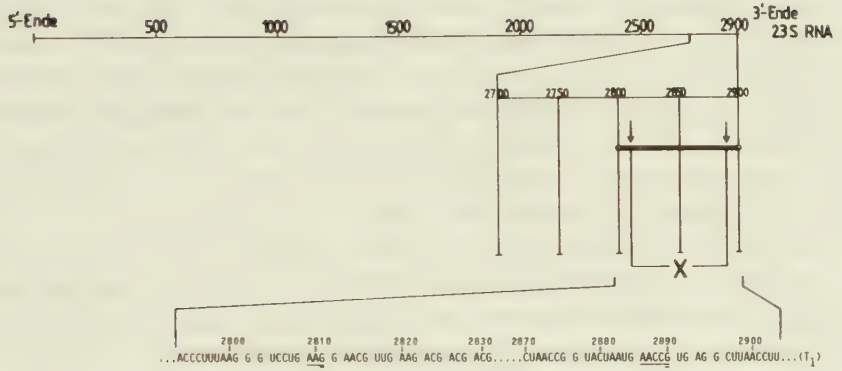


Abb. 47: Lokalisierung des durch N-Lost vernetzten Fragments J. Die vernetzten Nukleotide wurden doppelt unterstrichen (vgl. Text).

5.3. Untersuchung der durch UV-Bestrahlung induzierten in vivo Vernetzungen innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten

Die bislang mit Hilfe von UV-Bestrahlung oder N-Lost durchgeführten Vernetzungsreaktionen (vgl. 4.4.2. und 4.4.1.2.) fanden in intakten 30S ribosomalen Untereinheiten, d.h. unter nativen Bedingungen (in situ) statt. Durch ultraviolette Bestrahlung der 30S ribosomalen Untereinheiten unter in vivo Bedingungen sollte gezeigt werden, daß es sich bei den bereits identifizierten Vernetzungen keinesfalls um Artefakte handelt, die dann womöglich zu einer falschen Interpretation der dreidimensionalen Organisation der 16S RNA Moleküle innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten führen könnten.

Für die in vivo Vernetzung wurden die E. coli Zellen, deren Wachstum kurz vorher gestoppt worden war, direkt mit der UV-Lampe bestrahlt (vgl. 4.4.3.). Nach der Abtrennung der 70S Ribosomen wurden die 30S ribosomalen Untereinheiten durch Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten isoliert (vgl. 4.2.2.) und anschließend einer partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 unterworfen (vgl. 4.5.1.). Wie bei den in situ Experimenten wurden die vernetzten RNA-Fragmente in einem zweidimensionalen Gelsystem getrennt (vgl. 4.6.1.2.). Die analysierten Fragmente stammten sowohl aus dem oberen als auch aus dem unteren Teil des eindimensionalen Gelstreifens.
Die Analyse der unter in vivo Bedingungen durch UV-Bestahlung vernetzen Fragmente K, L und M bestätigte die bereits bei den in situ Experimenten erzielten Vernetzungen der Fragmente E, D5 und C.

Fragment K

Fragment K wurde im Gegensatz zu Fragment E (vgl. auch 5.1.1.2.) nur nach einer partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 erhalten. Durch die Anwesenheit des Oligonukleotids GAAGAGU (Pos. 6-12) in der RNase A-Fingerprintanalyse konnte das 5' -Ende des Bereichs in Position 5 der 16S RNA lokalisiert werden. Das 3'-Ende wurde durch den Nachweis des Oligonukleotids GAAC (Pos. 64-67) im RNase A-Fingerprint bestimmt. Die Vernetzungsstellen beider Fragmente waren identisch.

Fragment L

Fragment L wurde im Gegensatz zu Fragent D5 (vgl. 5.1.1.2.) ebenfalls nur nach einer partiellen Hydrolyse mit RNase V_1 erhalten. Es liegt wie Fragment D5 in dem 16S RNA-Bereich zwischen den Positionen 460 und 580.
Die hier ermittelte Vernetzungsstelle war ebenfalls identisch

mit der des Fragments D5.

Fragment M

Dieses Fragment liegt genauso wie Fragment C (vgl. 5.1.1.2.) innerhalb der Positionen 1160-1400 der 16S RNA. Die bei beiden Fragmenten gefundene Vernetzungsstelle stimmte auch in diesem Fall überein.

6. DISKUSSION

6.1. RNA-RNA Vernetzungen innerhalb der ribosomalen Untereinheiten

Die detaillierte Aufklärung der dreidimensionalen Organisation der ribosomalen RNA innerhalb der intakten ribosomalen Untereinheiten ist eine der wichtigen Aufgabenstellungen bei der Untersuchung der Ribosomen. Ausgehend von den Primärsequenzen wurden einige Sekundärstrukturmodelle der rRNA Moleküle vorgeschlagen. Die Sekundärstrukturen der 16S und 23S RNA-Moleküle sind bis auf wenige Bereiche heutzutage bereits aufgeklärt. Es stellt sich nun die Frage, wie diese Sekundärstrukturen innerhalb der nativen Ribosomen in ihre dreidimensionale Struktur gefaltet werden.
In dieser Arbeit wurde versucht, diese Problematik durch intramolekulare RNA-Quervernetzungen zu klären. Dabei wurden die RNA-Moleküle in intakten 30S ribosomalen Untereinheiten entweder durch UV-Bestrahlung oder durch das Reagenz N-Lost quervernetzt. Nach einer partiellen Hydrolyse mit Ribonuklease wurden die vernetzten Fragmente von den unvernetzten in einem zweidimensionalen Gelystem getrennt. Nach Isolierung der vernetzten Fragmente wurden die Vernetzungsstellen in einem Fingerprintsystem analysiert und identifiziert.

Die Auswahl der bei der partiellen Hydrolyse verwendeten RNasen und die zusätzliche Verkleinerung der vernetzten Fragmente durch Nachhydrolyse spielt eine große Rolle für die Identifizierung der Vernetzungsstelle. Zwieb et al (1980) und Glotz et al (1981) verwendeten bei ihren Experimenten RNase T_1 für die partielle Hydrolyse. Sie konnten damit nur sekundäre Strukturvernetzungen in der 16S- bzw. 23S RNA identifizieren.

Erst nach Einführung der doppelstrangspezifischen RNase V_1 für die partielle Hydrolyse der vernetzten RNA innerhalb der ribosomalen Untereinheiten konnten Stiege et al (1982, 1983) nicht nur sekundäre, sondern auch tertiäre Strukturvernetzungen in der 23S- bzw. 5S RNA lokalisieren.
In dieser Arbeit wurde ebenfalls RNAse V_1 für die partielle Hydrolyse der vernetzten RNA Moleküle verwendet. In einigen Fällen konnten sowohl die durch UV-Bestrahlung als auch die durch N-Lost erzielten tertiären Strukturvernetzungen innerhalb der 30S Untereinheiten erst durch eine Kombination von RNase V_1 und RNase H für die partielle RNA-Hydrolyse (vgl. 4.5.1. und 4.5.3.) identifiziert werden (Atmadja et al., 1985).

Psoralen-Derivate, von denen bekannt ist, daß sie Moleküle in doppelhelikale Bereiche der Nukleinsäuren interkalieren können, wurden von anderen Autoren als Vernetzungsreagenzien verwendet. Elektronenmikroskopische Bilder der mit diesen Reagenzien vernetzten RNA Moleküle zeigen Schleifen verschiedener Größe, die auf Psoralenvernetzungen an mehreren Stellen der 16S RNA zurückzuführen sind (Wollenzien et al., 1979). Die Genauigkeit solcher Vernetzungsstellen wurde auf ± 50 Nukleotide bestimmt (Wollenzien und Cantor, 1982a und b).

Auch Glyoxal-Derivate wurden für die Vernetzungsreaktionen verwendet; mit diesen bifunktionellen Reagenzien konnten Vernetzungen in der 16S RNA erzielt werden (Expert-Bezancon, 1980; Expert-Bezancon et al., 1983). Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß sämtliche Vernetzungen mit diesen Reagenzien entweder mit isolierter 16S RNA oder mit inaktiven 30S Untereinheiten durchgeführt wurden (Wollenzien et al., 1985; Expert-Bezancon und Wollenzien, 1985).

Wie die EM-Aufnahmen zeigen, können die unter bestimmten Ionenkonzentrationen isolierten RNA-Moleküle eine kompakte Struktur besitzen, die ähnlich der RNA- Struktur in den ribosomalen Untereinheiten ist (Vasiliev, 1978). Es muß allerdings

eine Reihe bestimmter Proteine vorhanden sein, damit die RNA die gleiche Gestalt wie in den ribosomalen Untereinheiten annehmen kann (Serdyuk et al., 1983). Vergleicht man die 30S ribosomalen Untereinheiten mit der isolierten 16S RNA anhand von physikalischen Messungen, so wird eine Ähnlichkeit festgestellt (Vasiliev, Ribosome Conference, Texas, 1985). Die meisten der mit isolierter 16S RNA erhaltenen Quervernetzungen liegen gut in der Sekundärstruktur. Es wird angenommen, daß die Sekundärstrukturen der isolierten RNA und der Untereinheiten gleich sein können; man weiß allerdings noch recht wenig über ihre Tertiärstrukturen.

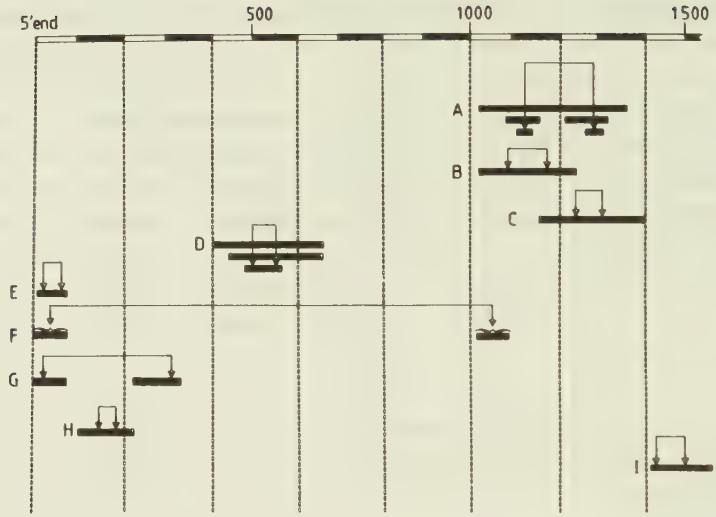
Um die Möglichkeit, daß es sich bei der erhaltenen UV-Vernetzungen um Isolierungsartefakte handelt, auszuschließen, wurde die UV-Bestrahlung unter *in vivo* Bedingungen durchgeführt (vgl. auch 4.4.3.). Es konnten dabei einige der unter *in situ*-Bedingungen erhaltenen Vernetzungen ebenfalls nach der *in vivo* Bestrahlung gefunden werden.

6.2. Analyse der durch UV-Bestrahlung induzierten RNA-RNA Vernetzungen innerhalb der 16S RNA

Die in dieser Arbeit beschriebenen UV-Vernetzungen innerhalb der 16S RNA können in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe besteht aus den Sekundärstrukturvernetzungen C und D und die andere aus den Tertiärstrukturvernetzungen A, B, E und F (vgl. auch Tabelle 11); sie stammen sowohl aus dem "Körper"- als auch aus dem "Kopf"-Bereich der 30S Untereinheiten. Anhand von bekannten RNA-Protein Wechselwirkungsdaten konnten einige Bereiche der 16S RNA lokalisiert werden, beispielsweise der bereits erwähnte "Kopf"-Bereich (Nukleotide 926-1295) (Übersicht bei Brimacombe et al., 1983). Die Sekundärstrukturvernetzungen liefern zusätzliche Informationen für die vorgeschlagenen Sekundärstrukturmodelle der rRNA- Moleküle. Die Tertiärstrukturvernetzungen sind Vernetzungen, die sowohl in der Primär- als auch in der

Sekundärstruktur weit entfernt liegende RNA-Bereiche miteinander verbinden. Sie sind sehr wichtig für die Entwicklung des dreidimensionalen Modells der ribosomalen RNA Moleküle.

Zur besseren Übersicht wurden die bereits genannten UV-Vernetzungsstellen und die durch N-Lost hervorgerufenen Vernetzungen zusammengefaßt (Abb. 48) und ihre Lokalisierung im Sekundärstrukturmodell der 16S RNA der "Berlin"-Gruppe (Maly und Brimacombe, 1983) in der Abb. 49 gezeigt.



Fragment A: ...CAACCCUUAUCCUUUG UG CCAG CG G UCCG G CCG G G AACUCAAAG.....CAG CG G ACCUCAUAAAG UG CG UCG UAG UCCG G AUUG...

Fragment B: ...UUG UG AAAUG UUG G G UUAAG UCCCG CAACG.....AACUCAAAG G AG ACUG CCAG UG AUAAACUG G AG...

Fragment C: ...CUACACACG UG CUACAAUG G CG CAUACAAAG.....ACCUCAUAAAG UG CG UCG UAG UCCG G AUUG G AG UCUG CAACUCG...

Fragment D: ..ACG UUACCCG CAG AAG AAG CACCG G CUAACUCCG UG CCAG CAG CCm⁷C CG G UAAUACG G AG G G UG CAAG CG UUAAUCG...

Fragment E: ...AAG AG UUUG AUCAUG G CUCAG AUUG AACG CUG G CG G CAG G CCUAACACAUG CAAG UCG AACG G UAACAG...

Fragment F: pAAAUUG AAG AG UUUG AUCAUG G CUCAG AUUG AACG CUG G CG G CAG G CCUAACACAUG CAAG UCG AACG G UAACAG...
...AAUG UG CCUUCG G G AACCG UG AG ACAG G UG CUG CAUG G CUG UCG UCAG CUCG UG UUG UG AAAUG UUG G G UUAAG UCCCG...

Fragment G: pAAAUUG AAG AG UUUG AUCAUG G CUCAG AUUG AACG CUG G CG G CAG G CCUAACACAUG CAAG UCG AACG...
...GGUAACG G CUCACCUAG G CG ACG AUCCCUAG CUG G UCUG AG AG G AUG ACCAG CCACACUG G AACUG AG ACACG G UCCAG...

Fragment H: ...UAAUG UCUG G G AAACUG CCUG AUG G AG G G G GAUAACUACUG G AAACG G UAG CUAAUACCG CAUAACG UCG CAAG ACCAAAG...

Fragment I: ...Um⁵CACACCAUG G G AG UG G G UUG CAAAAG AAG UAG G UAG CUAAACCUUCG.....AUUCAUG ACUG G G G UG AAG UCG UAACAAG..

Abb. 48: Übersicht der in dieser Arbeit gefundenen Vernetzungsstellen. Die vernetzten T_1-Oligonukleotide wurden unterstrichen. Die präzisen Vernetzungsstellen wurden doppelt unterstrichen.

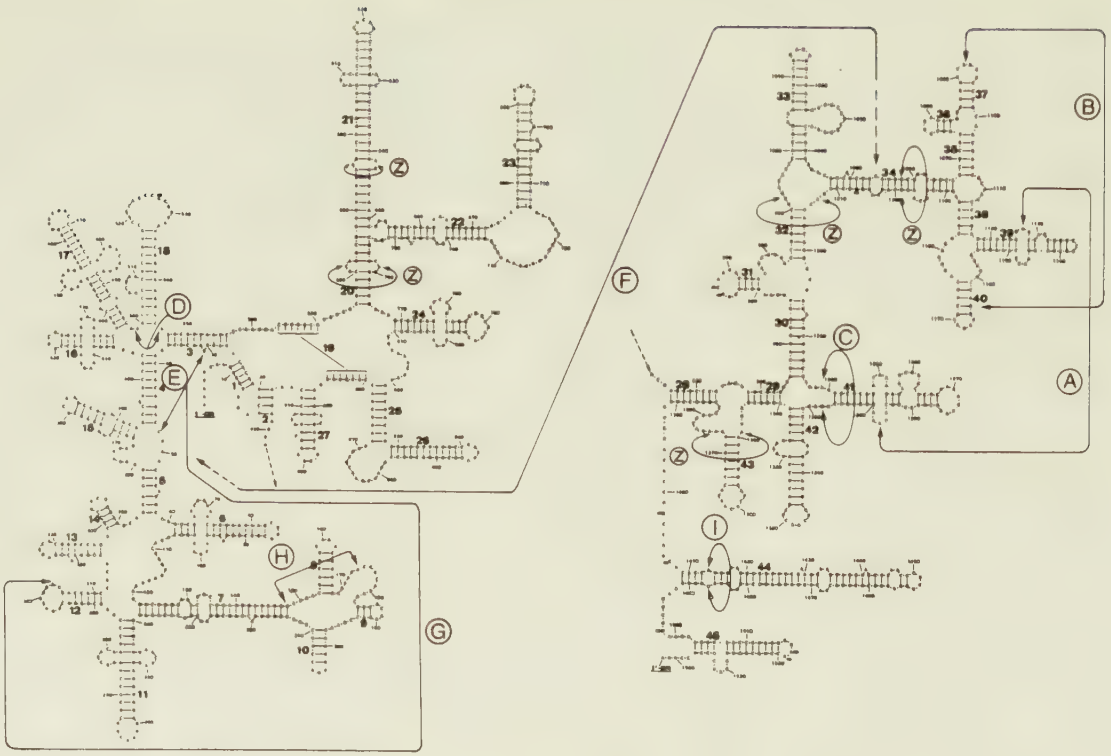


Abb. 49 : Lokalisierung der in dieser Arbeit identifizierten Vernetzungsstellen innerhalb des Sekundärstrukturmodells der 16S RNA der "Berlin"- Gruppe (Maly und Brimacombe, 1983). A-F sind durch UV-Bestrahlung, G-I durch N-Lost induzierte Vernetzungen. Die Vernetzungen, die von Zwieb und Brimacombe (1980) in der 16S RNA lokalisiert worden sind, wurden mit dem Buchstaben Z versehen.

Tertiärstrukturvernetzungen

Vernetzungen A und B

Durch die Kombination von Tertiärstrukturvernetzungen zwischen den Helices 37 und 40 sowie zwischen 39 und 41 einerseits mit der bereits bekannten mehrfachen Vernetzungsstelle des Proteins S7 in den Helices 41 (Zwieb und Brimacombe, 1979) und 43 (Wower und Brimacombe, 1983) anderseits bildet sich allmählich die Konfiguration der 16S RNA-Region im "Kopf"-Bereich der 30S Untereinheiten und des Bereichs am 3'-Ende des 16S RNA Moleküls heraus.

Vernetzung E

Die tertiäre Vernetzung von Fragment E wurde im Bereich des 5'-Endes der 16S RNA gefunden. Sie konnte sowohl unter in-situ - als auch unter in vivo- Reaktionsbedingungen erzielt werden.

Die zwei ineinander übergehenden Helices 3 und 4 wurden zwischen den aus den Helices herausragenden Nukleotiden G-31 (Helix 3) und C-48 (Helix 4) miteinander verknüpft (vgl. auch Abb. 49). Bei der ersten Betrachtung der Sekundärstruktur der 16S RNA der "Berlin"-Gruppe (Maly und Brimacombe, 1983) war zunächst nicht klar ersichtlich, ob diese beiden Nukleotide überhaupt einander angenähert werden können.

Voraussetzung für eine Vernetzung mit UV-Licht ist nämlich, daß die an ihr beteiligten Nukleotide praktisch in einem "Nullabstand" und in einer bestimmten räumlichen Orientierung zueinander liegen. Um dies zu klären, wurde mit Hilfe von Nicholson-Bausteinen ein detailliertes Modell der Helices 3 und 4 gebaut. Diese wurden so gefaltet, daß sie antiparallel zueinander standen; dann wurden ihre Achsen durch eine Drehung

in eine Stellung von etwa 45° zueinander gebracht.
Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die Nukleotide G-31 und C-48 tatsächlich eine Position innehaben können, die die o.g. Anforderungen erfüllt. Das Nukleotid Adenin (A-397) der Helix 4 ragt so heraus, daß es genau zu der großen Vertiefung (major groove) der Helix 3 hinzeigt (vgl. Abb. 50).

Diese Quervernetzungsstelle verlangt eine starre Konfiguration in der Orientierung der Helices 3 und 4. Von der zentralen Stellung dieser Helices in der Sekundärstruktur der 16S RNA kann geschlossen werden, daß diese starre Konfiguration für die dreidimensionale Anordnung des 16S RNA-Moleküls eine besondere Bedeutung hat.

Die Vernetzung zwischen G-31 (Helix 3) und C-48 (Helix 4) hat noch eine weitere wichtige Auswirkung für den Bau des dreidimensionalen Modells der rRNA Moleküle.
Noller et al. (1984) haben, ausgehend von der Koaxialität der bereits aufgeklärten 3D-Struktur des tRNA Moleküls, Kriterien für eine koaxiale Stapelung der Helices in den um ein Mehrfaches größeren und komplexeren ribosomalen RNA- Molekülen vorgeschlagen. Danach würde es sich bei den miteinander verknüpften Helices 3 und 4 um ein Beispiel für eine solche Koaxialität handeln. Durch den Modellbau konnte nun gezeigt werden, daß sich die beiden Helices tatsächlich in einer fast antiparallelen Lage zueinander befinden (vgl. Abb. 50). Obwohl die koaxiale Stapelung der Helices zweifellos eine wichtige Rolle in der Struktur der 16S und 23S RNA spielt, scheint es im Augenblick verfrüht zu sein, diese hypothetischen Kriterien für den Bau des dreidimensionalen Modells zu verwenden.

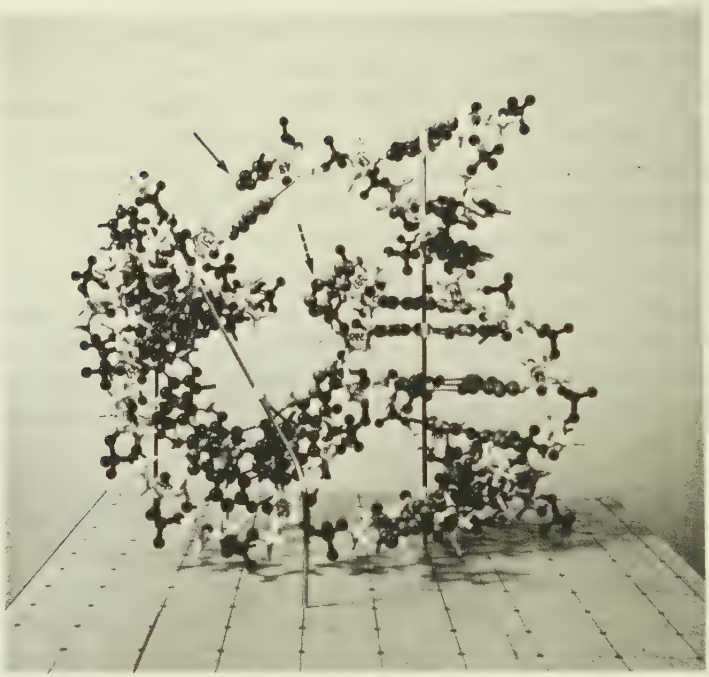


Abb. 50: Das Nicholson-Baumodell der Helices 3 und 4 (die einzelnen Basen wurden entsprechend numeriert). Die Position der beiden UV-vernetzten Nukleotide G-31 und C-48 wird durch ⟶, das aus der Helix 4 herausragende Nukleotid Adenin (A-397) durch ---→ gezeigt.

Vernetzung F

Wie die Analyse des vernetzten Fragments F zeigt, (vgl. 5.1.1.2.) fand die Verknüpfung zwischen zwei weit voneinander entfernt liegenden Bereichen der 16S RNA (Pos. 1-75 und 1020-1090) statt. Die genaue Vernetzungsstelle konnte hier nicht lokalisiert werden.

Diese Vernetzung stellt die erste tertäre RNA-Vernetzung bei der in situ Vernetzungsreaktion innerhalb der 30S ribosomalen Untereinheiten dar, die die Bereiche zwischen "Kopf" und "Körper" der 30S Untereinheiten verknüpft. Für die genannten Regionen wurde bereits die Möglichkeit einer intramolekularen Konformationsschaltung ("switch") der 16S- RNA Moleküle vorgeschlagen. Über diese Konformationsschaltung wurde erstmalig von Glotz und Brimacombe (1980) berichtet. Bei ihren Experimenten zur Isolierung von basengepaarten Regionen konnten sie eine Wechselwirkung zwischen zwei weit voneinander entfernt liegenden Bereichen innerhalb der 16S RNA, nämlich zwischen den Oligonukleotiden 35-45 und 1059-1069, zeigen.

Diese tertiäre Strukturvernetzung zeigt zusammen mit den in den Fragmenten A und B gefundenen tertiären Strukturvernetzungen, daß in der Tat die Regionen der Helices 1-6 (am 5'-Ende der 16S RNA) der "Körper"-Region und der Helices 33-37 der "Kopf"-Region direkt benachbart sein müssen (vgl. auch Abb. 49).

Ebenfalls wurden Konformationsschaltungen anhand der Quervernetzungen mit Psoralen als Reagenz vorgeschlagen (Thompson und Hearst, 1983a).
Durch die Analyse einer Reihe von basengepaarten Fragmenten der eukaryontischen 18S RNA von Xenopus laevis wurde auch eine Wechselwirkung zwischen Regionen innerhalb dieser Moleküle, die auf eine Konformationsschaltung schließen läßt (Atmadja et al., 1984), gefunden.

Über die Konformationsschaltungen der rRNA Moleküle weiß man zur Zeit relativ wenig; man kann sich aber vorstellen, daß sie eine funktionelle Bedeutung haben.

Sekundärstrukturvernetzungen

Vernetzung C

Diese Sekundärstrukturvernetzung wurde sowohl unter *in situ*- als auch unter *in vivo*-Reaktionsbedingungen gefunden. Innerhalb der Bereiche der vernetzten Oligonukleotide 1234-1241 und 1298-1300 ist eine ebenfalls durch UV-Licht induzierte Vernetzungsstelle zwischen dem Oligonukleotid 1238-1240 und dem Protein S7 identifiziert worden (Zwieb und Brimacombe, 1979). Diese zuletzt genannte RNA-Protein Vernetzung kann auch durch das Reagenz 2-Iminothiolan hervorgerufen werden (Wower und Brimacombe, 1983).

Vernetzung D

Ebenfalls wie die Vernetzung C wurde auch diese sekundäre-Strukturvernetzung sowohl unter *in situ*- als auch unter *in vivo*-Bedingungen gefunden. Sie fand zwischen Oligonukleotiden, die ausschließlich aus Purin-Basen bestehen, statt: GAAG (497-500) und AAG (546-548). Dieses für eine Vernetzung durch UV-Bestrahlung mögliche Vernetzungsprodukt wurde auch bei der UV-Vernetzung der 23S RNA beobachtet (Stiege et al., 1983).
Bei weiteren Experimenten konnte das Vorhandensein einer heterogenen Vernetzungsstelle bei einem der vier, dem Nukleotid G-497 benachbarten Adenin-Nukleotide nicht ausgeschlossen werden, da das Oligonukleotid AAG bei der Sekundäranalyse des vernetzten Flecks X gefunden wurde (vgl. 5.1.1.2., Fragment D). Die Anwesenheit von AAG kann nur dadurch erklärt werden, daß die Vernetzung mit den A-Nukleotiden 495/496 oder 498/499 stattgefunden hat.

6.3. Analyse der durch N-Lost induzierten RNA-RNA Vernetzungen innerhalb der 16S RNA

Das irreversible Vernetzungsreagenz Bis-(2-chlorethyl)-methylamin/N-Lost wurde erfolgreich für die RNA-RNA Vernetzungsreaktionen innerhalb der 50S Untereinheiten angewandt (Stiege et al., 1983). Das Reagenz N-Lost reagiert in Nukleinsäuren bevorzugt mit der Base Guanin und greift dort das Atom N-7 an. Der Reaktionsweg der Lost-Derivate soll anhand von Bis-(2-chlorethyl)-methylamin (I) dargestellt werden (Übersicht bei Parish, 1972). Zunächst verläuft er in einer langsamen Reaktion über ein zyklisches Kation (II), das dann seinerseits das nukleophile Zentrum N-7 eines Guaninrestes angreift (III). Ein weiterer nukleophiler Angriff auf einen anderen Guaninrest kann jetzt durch den zweiten reaktiven "Arm" von III stattfinden. Es entsteht dann das Vernetzungsprodukt IV oder bei der Reaktion mit Wasser das monoalkylierte Produkt V (vgl. Abb. 51).

Bei der Alkylierungsreaktion mit Nukleinsäuren reagiert das N-Lost nicht nur hauptsächlich mit Guaninresten; es kann außerdem auch mit Adeninresten reagieren. Das N-1 eines Adeninrestes hat die höchste Elektronennegativität innerhalb dieses Moleküls und stellt auch deshalb einen guten Angriffspunkt für ein elektrophiles Reagenz dar.

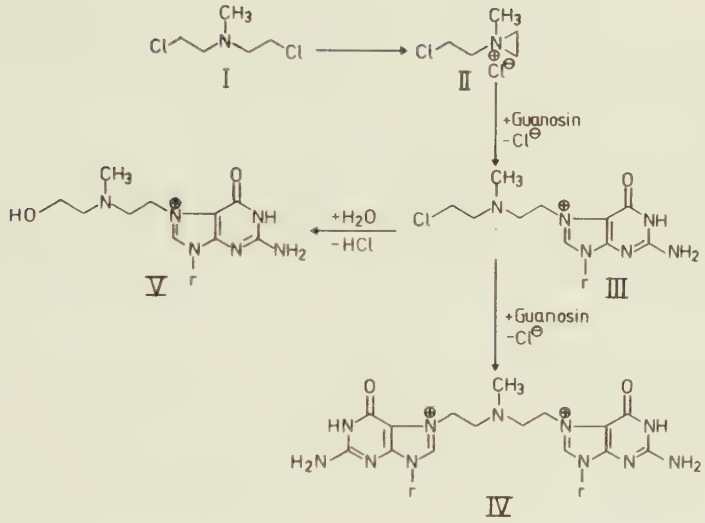


Abb. 51: Reaktionsschema des für die Vernetzungsreaktion verwendeten Bis-(2-chlorethyl)-methylamin/N-Lost (entnommen von Stiege, Dissertationsarbeit 1984).

Bei den durch N-Lost induzierten Vernetzungsstellen handelte es sich sowohl um die sekundäre Vernetzungen H und I als auch um die tertiäre Strukturvernetzungen G (vgl. auch Tabelle. 10).

Vernetzung G

Mit der in Fragment G gefundenen Vernetzung zwischen G-31 und G-305/A-306 wurde die Nachbarschaft der durch UV-Bestrahlung

gefundenen Vernetzungsstelle zwischen G-31 und C-48 unterstützt (vgl. auch Analyse des Fragments E in 6.2.); wegen dieser Nachbarschaft konnte manchmal auch eine heterogene Vernetzungsstelle (statt G-31 reagieren auch andere benachbarte G-Nukleotide mit G-305/A-306) beobachtet werden.

Diese Heterogenitätssituation (vgl. 5.1.1.2., Fragment G) wird klar, wenn man sich vorstellt, daß in der Tat G-31 und C-48 in der 16S RNA dicht benachbart liegen, wie dies durch die bereits genannte UV-Vernetzungsstelle im Fragment E gezeigt werden konnte.

Eine andere heterogene Vernetzungsstelle wurde ebenfalls innerhalb dieser Vernetzung und zwar am 3'-Teil festgestellt; es wurden hier als vernetzte Nukleotide anstelle von G-305 oder A-306 die Nukleotide in den Positionen 293 bis 297 gefunden.
Diese "lokale" Heterogenität der Vernetzungsstelle kann folgendermaßen erklärt werden: Entweder ist die Vernetzung auf die Flexibilität des verwendeten Reagenzes N-Lost zurückzuführen oder sie deutet auf die Flexibilität der 16S RNA Struktur selbst hin. Eine dritte Möglichkeit wäre, daß es sich um eine geringfügige Verdrehung der Struktur handelt, hervorgerufen durch die Vernetzungsreaktion selbst.
Die Analyse der genauen Vernetzungsstelle wird erheblich erschwert, wenn zwei mögliche Vernetzungsstellen existieren.

Mit dieser Vernetzung,der bereits erwähnten UV-Vernetzungsstelle im Fragment E und den an mehreren Bereichen des 5'-Endes identifizierten Vernetzungsstellen des Proteins S4 (Zimmermann, 1980) konnte man zeigen, daß die gesamten Bereiche am 5'-Ende des 16S RNA Moleküls eine sehr dichte Tertiärstruktur haben müssen.

Vernetzung H

Im Sekundärstrukturmodell der 16S RNA der "Berlin"-Gruppe (Maly und Brimacombe, 1983) befindet sich das vernetzte Fragment H im Bereich der Helices 7 bis 10. Das eine vernetzte Nukleotid G-148 liegt am Ende der Helix 7, dagegen befindet sich das andere vernetzte Nukleotid A-174 an einer Schleife zwischen den Helices 8 und 9 (vgl. Abb. 52a).
Beim Vergleich der 16S RNA-Sekundärstrukturmodelle der "Berlin"- und der "California"-Gruppe (Noller, 1984) fällt auf, daß der Hauptunterschied in den RNA-Regionen mit 6 Basenpaarungen (143-148/204-209) der Helix 7 und in denen mit 5 Basenpaarungen (198-202/206-210) der Helix 10 liegt; die Sekundärstrukturen der vernetzten Bereiche weichen hier auch deutlich voneinander ab. Die bereits erwähnte Vernetzungsstelle wurde innerhalb dieser umstrittenen Bereiche gefunden; sie entspräche im Sekundärstrukturmodell der "Berlin"-Gruppe einer tertiären, im Modell der "California"-Gruppe aber einer sekundären Strukturvernetzung (vgl. 52b).

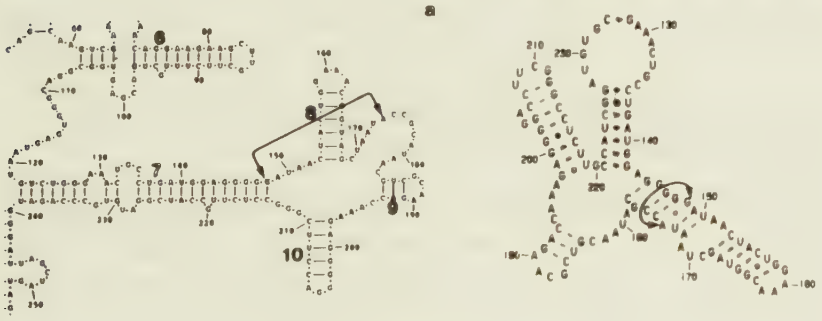


Abb. 52: a. Lage der N-Lost Vernetzung des Fragments H im 16S RNA Sekundärstrukturmodell der "Berlin"-Gruppe (Maly und Brimacombe, 1983). Die miteinander vernetzten Nukleotide wurden mit ⟷ gekennzeichnet (vgl. Text).
b. Lage der N-Lost Vernetzung des Fragments H im 16S RNA Sekundärstrukturmodell der "California"-Gruppe (Noller et al.,

1984). Die miteinander vernetzten Nukleotide wurden mit ⟷ gekennzeichnet (vgl. Text).

Vernetzung I

Bei dem vernetzten Fragment I handelt es sich um eine sekundäre Strukturvernetzung; in diesem Fall wurde ebenfalls eine G-A-Vernetzung ermittelt.
Im Sekundärstrukturmodell der 16S RNA der "Berlin"-Gruppe (Maly und Brimacombe, 1983) liegt die Vernetzungsstelle innerhalb der am 3'-Ende des Moleküls befindlichen Helix 44 und hat zwischen den leicht "hervorstehenden" Nukleotiden A (1413) und G (1487) stattgefunden (vgl. Abb. 49).
Im Sekundärstrukturmodell der 16S RNA der "California"-Gruppe (Noller et al., 1984) liegt diese Vernetzung in einem doppelhelikalen Bereich; sie würde jedoch nicht der Watson-Crick-Basenpaarungsregel entsprechen. Diese Basenpaarung wurde ebenfalls bei der Verfeinerung des ursprünglichen Sekundärstrukturmodells der 5S RNA (Woese et al., 1980) anhand der phylogenetischen Vergleichsmethode vorgeschlagen.

6.4. Analyse der durch N-Lost induzierten RNA Vernetzungen in 70S Ribosomen

Für die Strukturaufklärung der Bestandteile der ribosomalen Untereinheiten an deren Kontaktfläche ("Interface") wurde ebenfalls die Vernetzungsreaktion mit N-Lost als Reagenz durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, konnten Zwieb et al. (1978) die beiden ribosomalen RNAs verknüpfen, die genaue Vernetzungsstelle jedoch nicht identifizieren. Chiam and Wagner (1983) haben ebenfalls versucht, mit einem bifunktionellen Vernetzungsreagenz

die Kontaktflächenregionen zu vernetzen. Sie konnten zwar einige RNA-Protein Quervernetzungen feststellen, aber die genaue Vernetzungsstelle konnte wiederum nicht lokalisiert werden. Anhand von physikalischen Messungen der isolierten 16S- und 23S RNA wurde über eine Wechselwirkung zwischen den Molekülen berichtet (Burma et al., 1983). Die genauen RNA-Bereiche konnten auch hier nicht identifiziert werden.
Die in dieser Arbeit mit N-Lost durchgeführten Vernetzungen in 70S Ribosomen führten nicht zu dem erhofften Ergebnis; es wurden zwar Vernetzungen zwischen der 16S- und der 23S RNA nachgewiesen, die genaue Vernetzungsstelle konnte aber nicht lokalisiert werden.
Die Identifizierung einer Vernetzungsstelle in 70S Ribosomen ist insofern nicht einfach, als die partielle Hydrolyse der RNA-Moleküle nach der Vernetzungsreaktion mit etwa 4500 Nukleotiden durchgeführt werden muß. Dieses Problem bei der Identifizierung der an der Kontaktfläche quervernetzten RNA sollte durch eine zielgerichtete Nachhydrolyse, z.B. mit Hilfe der RNase H wie im Fall der vernetzten 30S Untereinheiten, gelöst werden können.

Nach der Vernetzungsreaktion wurden die vernetzten 70S Ribosomen in einer Dichtegradientenzentrifugation getrennt (vgl. 4.2.3.). Dabei wurden auch die vernetzten 50S- bzw. 30S-Fraktionen isoliert. Bei diesen isolierten 50S Fraktionen konnte eine Vernetzungsstelle lokalisiert werden.
Die Analyse des vernetzten Fragments J zeigt, daß die Vernetzung in der 23S RNA zwischen den Nukleotiden G-2811 und G-2890 in den Einzelstrangbereichen am 3'-Ende dieses Moleküls stattgefunden hat.

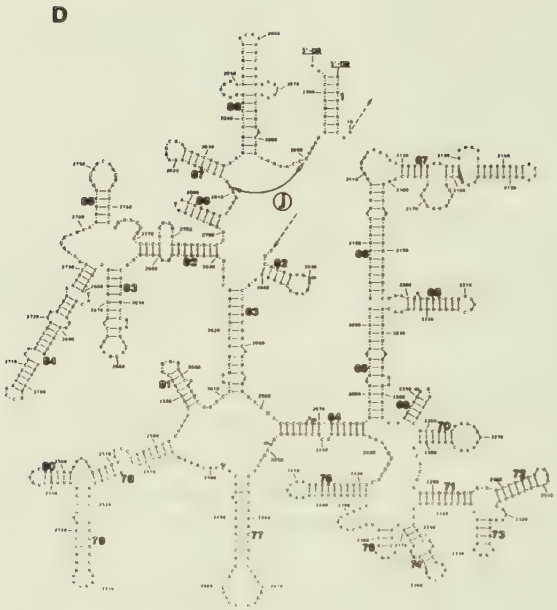


Abb. 53: Lokalisierung der N-Lost Vernetzungsstelle in der Domäne D der 23S RNA Sekundärstruktur (Maly and Brimacombe, 1983).

6.5. Dreidimensionaler Raummodellbau

Anhand einer Reihe von Daten der experimentell gefundenen Quervernetzungen innerhalb des 16S RNA Moleküls und einer Reihe anderer Daten, die z.B. durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen erhalten wurden, wird z. Zt versucht, ein dreidimensionales Modell dieses Moleküls zu konstruieren.

Zunächst wurden die Helices des in 4.9. beschriebenen Modells der 16S RNA so angeordnet, daß die miteinander vernetzten RNA-Bereiche dicht benachbart liegen.
Danach wurde die Lage der Helices, soweit die intramolekularen RNA-Quervernetzungen dies erlaubten, so verändert, daß die Helices Positionen einnehmen, die mit den bereits mit Hilfe der Immun-Elektronenmikroskopie (IEM) (Breitenreuter et al., 1984) und der Neutronenstreuungsexperimente (Ramakrishnan et al., 1984) lokalisierten ribosomalen Proteine in der 30S Untereinheiten benachbart sind.
Außerdem wurden die Ergebnisse der ermittelten RNA-Protein Vernetzungen und die durch die IEM lokalisierten 5'- und 3'-Enden der 16S RNA in dieses Modell einbezogen.
So konnte die Lage einiger RNA Bereiche in dem "Kopf" der 30S Untereinheit, anhand der tertiären Strukturvernetzungen der Fragmente A bzw. B (vgl. auch 6.2.; Atmadja et al., 1985) und der mehrfachen Vernetzungsstelle des Proteins S7 in der 16S RNA (Wower et al., 1983) bestimmt werden. Ausserdem wurde die Lage vieler Sekundärstrukturelemente im "Körper"-Bereich der 30S Untereinheiten durch eine Kombination folgender Ergebnisse festgelegt: a) die immunelektronenmikroskopische Lokalisierung der methylierten Basen in den Positionen 527 und 1518/1519; b) die Quervernetzung zwischen einem tRNA-Molekül und dem Nukleotid 1400; c) die Lokalisierung der 5' und 3' Enden der 16S RNA durch Immunelektronenmikroskopie; d) die Bestimmung der Vernetzungsstellen der Proteine S8, S17 und S21 auf der 16S RNA Kette. Das auf diese Weise entstandene dreidimensionale Raummodell für die 16S RNA ist in Abb. 54 wiedergegeben.

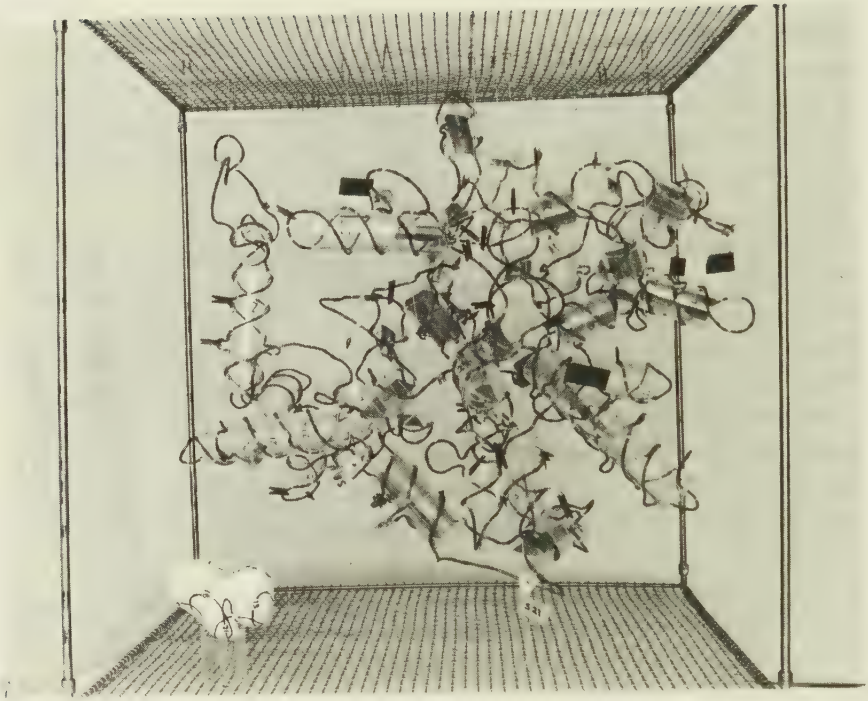


Abb. 54: 3D-Raummodellbau der 16S RNA. Die RNA-RNA- bzw. RNA-Protein-Vernetzungsstellen wurden entsprechend gekennzeichnet, z.B. S4, S8, S21.

Die Position des Proteins S8, das an drei Stellen mit der 16S RNA vernetzt ist, stimmt mit der Proteinbindungsstelle in den 30S Untereinheiten überein (Thurlow et al., 1983). Es konnte außerdem festgestellt werden, daß alle drei Vernetzungsstellen auf der gleichen Seite in der Helix 21 liegen (Wower und Brimacombe, 1983). Diese Quervernetzungsdaten liefern zusätzliche Informationen über die Lage des Proteins im Verhältnis zur betreffenden Helix innerhalb der 30S Untereinheiten.

Das Protein S17 ist mit einem der Oligonukleotide vernetzt, mit dem auch S8 verknüpft ist (A. Kyriatsoulis und R. Brimacombe, unveröffentliche Ergebnisse).
Ein kürzlich mit Hilfe der Neutronenstreuung erhaltenes Ergebnis zeigt, daß S17 und S8 im unteren Teil der 30S Untereinheiten sehr dicht beieinander liegen (P. Moore, Ribosome Conference, Texas, 1985).

Aus der Tatsache, daß sich die Proteinbindungsstelle von S17 in der 5'-Region der 16S RNA befindet (Zimmermann et al., 1980) und daß S17 und S8 dicht beeinander liegen, kann abgeleitet werden, daß sowohl die 5'-Region als auch die Helix 21 im unteren Teil der 30S Untereinheiten liegen (vgl. auch Abb. 55). Im Unterschied zur 16S RNA enthält die eukaryontische 18S RNA insgesamt etwa 200 Nukleotide mehr. Diese sind hauptsächlich an der Verbindungsstelle zwischen den Helices 7 und 11 (in der Region um das Nukleotid 200 in der 5'-Domäne) und im Bereich der Helix 21 (in der Region um das Nukleotid 580) eingefügt (Atmadja et al., 1984).
Es wird daher angenommen, daß diese "Einfügungen", an der "Basis" im unteren Teil der 30S Untereinheiten liegen (Lake et al., 1983).

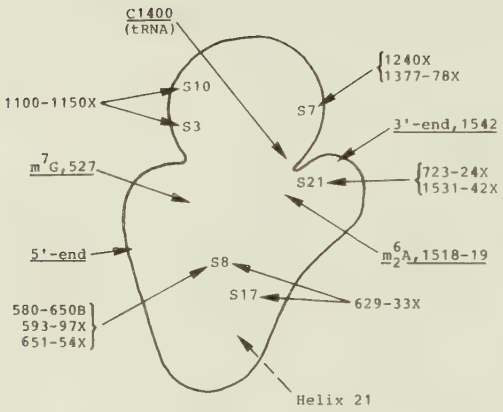


Abb. 55: Lokalisierung von rRNA Regionen der 30S Untereinheit, die durch IEM ermittelt wurden. Mit"B" wird eine Proteinbindungsstelle an der 16S RNA und mit "X" eine RNA-Vernetzungsstelle bezeichnet.

Innerhalb der Zentralregion (570-880) der 16S RNA liegt eine kürzlich identifizierte potentielle N-Lost Vernetzungsstelle (R. Brimacombe, unveröffentlichte Ergebnisse) zwischen den Nukleotiden G-693 (Helix 23) und G-799 (Helix 24). Durch diese Verknüpfung wird ein gewisser "Zwang" auf die Orientierung der Helices, d.h. die Faltung der Sekundär- zur Tertiärstruktur, ausgeübt (Übersicht bei Noller et al., 1984, und Brimacombe, 1985).
Die Identifizierung gerade solcher Verknüpfungen ist besonders wichtig für die Aufklärung der Tertiärstruktur der RNA innerhalb der 30S Untereinheiten. Weitere, einen "Zwang" ausübende Vernetzungen findet man bei den Proteinen S21 und S7. Protein S21 ist an zwei Stellen mit der 16S RNA verknüpft, nämlich mit

den Nukleotiden 723/724 (Helix 23) und dem Oligonukleotid 1531-1542 (Helix 45) am 3'-Ende des Moleküls (A. Kyriatsoulis und R. Brimacombe, unveröffentlichte Ergebnisse; Czernilofsky et al., 1975). Da S21 ein sehr kleines Protein ist, handelt es sich hierbei praktisch um eine "intramolekulare RNA-Vernetzung". Die Vernetzung zwischen den Helices 23 und 24 einerseits und von S21 mit den Helices 23 und 45 andererseits zeigt deutlich die Faltung der Sekundärstruktur an dieser Stelle. Die genannten Vernetzungen befinden sich im Vorsprung unterhalb des "Kopfes", der sog. "Plattform".

Das Protein S7 ist mit den Helices 41 und 43 vernetzt; die räumliche Anordnung dieser drei Vernetzungspartner kann man sich als eine Art "Tasche" vorstellen (Brimacombe, 1985). Zusammen mit der intramolekularen RNA-Vernetzung zwischen den Helices 39 und 41 (vgl. 5.1.1.2., Fragment A) bedeutet dies, daß die "Kopf"-Region, die aus den Helices 28 bis 43 besteht, topographisch der am besten definierte Bereich der 30S Untereinheiten ist.

Die Placierung der am 3'-Ende befindlichen Helix 44 innerhalb der 30S Untereinheiten ist nicht nur wegen ihrer Länge, sondern auch wegen der möglichen Starrheit des Moleküls schwierig. Noller et al. (1984) haben diese Helix in ihrem Modell so placiert, daß die Region um das Nukleotid 1500 in die Plattform hineinragt, während der Bereich um das Nukleotid 1400 zum "Kopf"-Bereich zeigt. Das würde bedeuten, daß der größere Teil der Helix 44 zur "Basis" der 30S Untereinheiten gerichtet ist. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, diese Hypothese zu bestätigen. Möglicherweise können weitere Quervernetzungsergebnisse zu einer Klärung beitragen.

Die bisher vorliegenden Daten versetzen uns in die Lage, mit jeder neu identifizierten Vernetzung das dreidimensionale Modell der rRNA in seinem Aufbau zu verfeinern.
Die mit dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse sollen dazu beitragen, eine weitere Etappe dieses Weges zu bewältigen, und

durch eine Kombination einer später vielleicht komplett vorliegenden Entschlüsselung der Tertiärstruktur der ribosomalen RNA mit weiteren Daten, z.B. denen von RNA-Protein Vernetzungen, sollte es möglich sein, die gesamte Raumstruktur der Ribosomen aufzuklären.

Tabelle 11: Zusammenfassung aller Fragmente mit eindeutig lokalisierten Vernetzungsstellen

Strahlung bzw. Reagenz	Fragmente	Bereiche innerhalb des RNA-Moleküls (*)	Quervernetzte Oligonukleotide	Art der Vernetzung
UV	A	1095-1315	1125 1127 1280 1290 UUG mit ACCUCAUAAAG	tertiär
	B	1025-1259	1090 1094 1161 1164 UUAAG mit CCAG	tertiär
	C#	1165-1400	1234 1241 1298 1300 CUACAAUG mit UAG	sekundär
	D#	476- 570	495 500 545 548 AAGAAG mit CAAG	sekundär
	E#	10- 72	28 35 47 57 AUUGAACG mit CCUAACACAUG	tertiär
	F	(1-75)-(1020-1090)	≈	tertiär
N-Lost	G	1-72 - 200- 350	28 35 303 309 AUUGAACG mit AUGACCAG	tertiär
	H	80- 200	148 158 169 177 GAUAACUACUG mit CUAAUACCG	tertiär
	I	1407-1542	1409 1415 1483 1487 CACCAUG mit ACUGG	sekundär
	J+	2795-2904	2809 2811 2886 2890 AAG mit AACCG	(sekundär)

Anmerkungen

*Die Basennummern der 16S RNA und 23S RNA wurden von Brosius et al. (1978, 1980) übernommen. Die Positionen beziehen sich auf die vernetzten RNase T_1-Oligonukleotide. Die Positionen in Klammern weisen auf die RNA Bereiche hin, zwischen denen eine mögliche Quervernetzung der Oligonukleotide innerhalb dieser Bereiche stattfinden kann, z.B. im Falle des UV-vernetzten Fragments F. Die miteinander vernetzten Oligonukleotide werden unterstrichen, die doppelt unterstrichenen zeigen die präzise vernetzten Nukleotide bzw. Oligonukleotide.

#Die gleichen Vernetzungsstellen wurden bei "in vivo" UV-Bestrahlungs-Experimenten gefunden.

≈Die genaue Vernetzungsstelle konnte nicht identifiziert werden; als eine mögliche Vernetzungsstelle wurde eine Quervernetzung zwischen den Nukleotiden (36-42) und (1058-1064) vorgeschlagen.

+Die Bereiche der Vernetzungsstelle innerhalb der 23S RNA.

7. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A_{260}	Absorption bei 260 nm
Å	Ångström (1Å ≙ 10 nm)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BPB	Bromphenolblau
C	Cytosin
Ci	Curie
cpm	counts per minute
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMAPN	Dimethylaminopropionitril
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
G	Guanin
g	Gramm
IEM	Immunelektronenmikroskopie
l	Liter
M	Mol
N-Lost	N,N-Bis-(2-Chlorethyl)-methylamin
PAA	Polyacrylamid
PEI	Polyethylenimin

r	ribosomal
rpm	round per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNase A	3.1.27.5. Enzymnomenklatur nach IUB (1978)
RNase T_1	3.1.27.3. " " " "
RNase T_2	3.1.27.1. " " " "
RNase H	
RNase V_1	
S	Svedbergkonstante
SDS	Natrium-dodecylsulfat
TEC	Triethylammoniumcarbonat
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uracil bzw. Enzymeinheit (unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	weight per volume
x	vernetzt mit
XC	Xylencyanol

8. LITERATURVERZEICHNIS

Allen, G., Capasso, R., Gualerzi, C. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9800-9806.

Atmadja, J., Brimacombe, R., Blöcker, H., Frank, R. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6919-6936.

Atmadja, J., Brimacombe, R., Maden, B.E.H. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 2649-2667.

Bernabeu, C., Lake, J.A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3111-3115.

Bernardi, A. (1974) Analyt. Biochem. 59, 501-507.

Boublik, M. (1984) In "Aantomy of Escherichia coli" (N. Nanninga, Hrsg.), Academic Press, New York.

Boublik, M., Robakis, N., Hellmann, W., Wall, J.S. (1982) Eur. J. Cell Biol. 27, 177- .

Branlant, C., Krol, A., Machatt, M.A., Pouyet, J., Ebel, J.P., Edwards, K., Kössel, H. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 4303-4324.

Breitenreuter, G., Lotti, M., Stöffler-Meilicke, M., Stöffler, G. (1984) Mol. Gen. Genet. 197, 189-195.

Brimacombe, R. (1984) Trends in Biochem. Sci, Vol. 9, No. 1, 273-277.

Brimacombe, R. (1985) In "3D Structure and Dynamics of RNA", Plenum Press, London.

Brimacombe, R., Atmadja, J., Kyriatsoulis, A., Stiege, W. (1985) Texas Ribosome Conference, Springer-Verlag, in press.

Brimacombe, R., Maly, P., Zwieb, C. (1983) Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., Vol. 28, 1-48.

Brimacombe, R., Stiege, W. (1985) Biochem. J. 229, 1-17.

Brookes, P., Lawley, P.D. (1961) Biochem. J. 80, 496-503.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4801-4805.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 201-204.

Brownlee, G.G., Sanger, F., Barrell, B.G. (1967) Nature 215, 735-736.

Burma, D.P., Nag, B., Tewari, D.S., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4875-4878.

Carbon, P., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Ebel, J.P. (1978) FEBS Lett. 94, 152-156.

Carbon, P., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Ebel, J.P. (1979) Eur. J. Biochem. 100, 399-410.

Changchien, L.M., Craven, G.R. (1979) J. Mol. Biol. 113, 103-122.

Chiam, C.L., Wagner, R. (1983) Biochemistry 22, 1193-1200.

Clark, M.W., Lake, J.A. (1984) J. Bacteriol. 157, 971-974.

Cover, J.A., Lambert, J.M., Normann, C.M., Traut, R.R. (1981) Biochemistry 20, 2843-2852.

Czernilofsky, A.P., Kurland, C.G., Stöffler, G. (1975) FEBS Lett. 58, 281-284.

Darlix, J.L. (1975) Eur. J. Biochem. 51, 369-376.

Edlind, T.D., Bassel, A.R. (1980) J. Bacteriol. 141, 365-373.

Erdmann, V.A., Appel, B., Digweed, M., Kluwe, D., Lorenz, S., Luck, A., Schreiber, A., Schuster, L. (1980) "Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes" (S. Osawa, H. Ozeki, H. Uchida, T. Yura, Hrsg.), Elsevier/Amsterdam, S. 639-654.

Evstafieva, A.G., Shatsky, I.N., Bogdanov, A.A., Semenkov, Y.P., Vasiliev, V.D. (1983) EMBO J. 2, 799-804.

Expert-Bezancon, A., Hayes, D. (1980) Eur. J. Biochem. 103, 365-375.

Expert-Bezancon, A., Milet, M. (1983) Eur. J. Biochem. 136,

267-274.

Expert-Bezancon, A., Wollenzien, P.L. (1985) J. Mol. Biol. 184, 53-66.

Fox, G.E., Woese, C.R. (1975) Nature 256, 505-507.

Garrett, R.A., Douthwaite, S., Noller, H.F. (1981) Trends Biochem. Sci. 6, 137-139.

Gilbert, W., Maxam, A.M. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 560-564.

Giri, L., Hill, W.E., Wittmann, H.G. (1984) Advances in Protein Chemistry, Vol. 36, 1-78.

Girshovich, A.S., Kurtskhalia, T.V., Ovchinnikov, Y.A., Vasiliev, V.D. (1981) FEBS Lett. 130, 54-59.

Glotz, C., Zwieb, C., Brimacombe, R., Edwards, K., Kössel, H. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 3287-3306.

Gornicki, P., Nurse, K., Hellmann, W., Boublik, M., Ofengand, J. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10493-10498.

Hancock, J., Wagner, R.A. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 1257-1269.

Hausen, P., Stein, H. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 278-283.

Keren-Zur, M., Boublik, M., Ofengand, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1054-1058.

Lake, J.A. (1976) J. Mol. Biol. 105, 131-159.

Lake, J.A. (1977) Proc.d Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1903-1907.

Lake, J.A. (1980) In "Ribosomes: Structure, Function and Genetics (G. Chambliss, J. Craven, K. Davies, L. Davis, L. Kahan, M. Nomura, Hrsg.), University Park Press, Baltimore, S. 171-205.

Lambert, J.M., Traut, R.R. (1981) J. Mol. Biol. 149, 451-476.

Lührmann, R., Stöffler-Meilicke, M., Dieckhoff, J., Tischendorf, G., Stöffler, G. (1980) In "Electron Microscopy" (P. Bredero, W. de Priester, Hrsg.) Eur. Congr. of

Electr. Microscopy, Leiden, S. 568-569.

Maassen, J.A., Schop, E.N., Möller, W. (1981) Biochemistry 20, 1020-1025.

Malbon, R.M., Parish, J.H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 246, 542-552.

Maly, P., Brimacombe, R. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 7263-7286.

Maly, P., Wower, J., Zobawa, M., Brimacombe, R. (1983) Biochemistry 22, 3157-3162.

McKuskie-Olson, H., Grant, P.G., Glitz, D.G., Cooperman, B.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 890-894.

Mochalova, L.V., Shatsky, I.N., Bogdanov, A.A., Vasiliev, V.D. (1982) J. Mol. Biol. 159, 637-650.

Möller, K., Brimacombe, R. (1975) Mol. Gen. Genet. 141, 343-355.

Moore, P.B. (1980) In "Ribosomes: Structure, Function and Genetics" (G. Chambliss, G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura, Hrsg.), University Park Press, Baltimore, S. 111-133.

Moore, P.B., Engelmann, D.M., Langer, J.A., Ramakrishnan, V.R., Schnindler, D.G. (1983) In "Basic Life Sciences Series" (B.P. Schoenborn, Hrsg.), New York.

Nierhaus, K.H. (1982) Current Topics in Microbiology and Immunology, 97, 82-148.

Nierhaus, K.H., Dohme, F. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4713-4717.

Nierhaus, K.H., Lietzke, R., Nowotny, V., Schulze, H., Wurmbach, P., Stuhrmann, H.B., May, R.P. (1983) Physica 120B, 426-435.

Noller, H.F. (1974) Biochemistry 13, 4694-4703.

Noller, H.F., Chaires, J.B. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3115-3118.

Noller, H.F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R.R., Kopylov, A.M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D.A., Gupta, R., Woese, C.R. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 6167-6189.

Noller, H.F., Lake, J.A. (1984) Membrane Structure and Function 6, 217-297.

Noller, H.F., Woese, C.R. (1981) Science 212, 403-411.

Nomura, M., Traub, P. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59, 777-784.

Nowotny, V., May, R.P., Nierhaus, K.H. (1985) Texas Ribosome Conference, Springer-Verlag, in press.

Ogawa, K., Kaji, A. (1975) Eur. J. Biochem. 58, 411-419.

Pettersson, I., Hardy, S.J.S., Liljas, A. (1976) FEBS Lett. 64, 135-138.

Pettersson, I., Liljas, A. (1979) FEBS Lett. 98, 139-144.

Parish, J.H. (1972) Principles and Practice of Experiments With Nucleic Acids. Longman Group Limited, London.

Politz, S.M., Glitz, D.G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1468-1472.

Ramakrishnan, V., Capel, M., Kjeldgaard, M., Engelman, D.M., Moore, P.B. (1984) J. Mol. Biol. 174, 265-284.

Rheinberger H.J., Sternbach H., Nierhaus K.H. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5310-5314.

Serdyuk, I.N., Agalarov, S.C., Sedelnikova, S.E., Spirin, A.S., May, R.P. (1983) J. Mol. Biol. 169, 409-425.

Shatsky, I.N., Evstafieva, A., Bystrova, T., Bogdanov, A., Vasiliev, V. (1980) FEBS Lett. 121, 97-100.

Shatsky, I.N., Evstafieva, A., Bystrova, T., Bogdanov, A., Vasiliev, V. (1980) FEBS Lett. 122, 251-255.

Shatsky, I.N., Mochalova, L.V., Kojouharova, M.S., Bogdanov, A.A., Vasiliev, V.D. (1979) J. Mol. Biol. 133, 501-505.

Shine, J., Dalgarno, L. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1242-1346.

Sieber, G., Tesche, B., Nierhaus, K.H. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 515-523.

Steitz, J.A. (1980) In "Ribosomes: Structure, Function and Genetics" (G. Chambliss, G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura, Hrsg.), University Park Press, Baltimore, S. 479-495.

Stiege, W.(1984) Dissertationsarbeit, Freie Universität Berlin.

Stiege, W., Glotz, C., Brimacombe, R. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 1687-1706.

Stiege, W., Zwieb, C., Brimacombe, R. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 7211-7229.

Stiegler, P., Carbon, P., Zuker, M., Ebel, J.P., Ehresmann, C. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 2153-2172.

Shevack, A., Gewitz, H.S., Hennemann, B., Yonath, A., Wittmann, H.G. (1985) FEBS Lett. 184, 68-71.

Stöffler, G., Bald, R., Kastner, B., Lührmann, R., Stöffler-Meilicke, M., Tischendorf, G., Tesche, B. (1980) In "Ribosomes: Structure, Function and Genetics (G. Chambliss, G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura, Hrsg.), University Park Press, Baltimore, S. 171-205.

Stöffler, G., Kastner, B., Stöffler-Meilicke, M. (1982) Electr. Microscopy, Hamburg 3, 105-106.

Stöffler, G., Hasenbank, R., Lütgehaus, M., Maschler, R., Morrison, C.A., Zeichhardt, H., Garrett, R.A. (1973) Mol. Gen. Genet. 127, 89-110.

Stöffler, G., Stöffler-Meilicke, M. (1981) In "International Cell Biology" (H.G. Schweiger, Hrsg.), Springer-Verlag, Heidelberg, S. 93-102.

Stöffler-Meilicke, M., Noah, M., Stöffler, G. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 6780-6784.

Stöffler-Meilicke, M., Stöffler, G., Odom, O.W., Zinn, A., Kramer, G., Hardesty, B. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5538-5542.

Subramanian, A.R. (1975) J. Mol. Biol. 95, 1-8.

Subramanian, A.R. (1983) Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 28, 101-142.

Terhorst, C., Möller, W., Laursen, R., Wittmann-Liebold, B. (1972) FEBS Lett. 28, 325-328.

Tesche, B., Schmiady, H., Lorenz, S., Erdmann, V.A. (1980) In "Electron Microscopy" (P. Brederoo, W. de Priester, Hrsg.), Eur. Congr. Electron Microscopy, Leiden, S. 534-535.

Thammana, P., Cantor, C.R., Wollenzien, P.L., Hearst, J.E. (1979) J. Mol. Biol. 135, 271-283.

Thompson, J.F., Hearst, J.E. (1983) Cell 32, 1355-1365.

Thurlow, D.L., Ehresmann, C., Ehresmann, B. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 6787-6802.

Tischendorf, G.W., Tesche, B., Stöffler, G. (1976) In "Sixth European Congress on Electron Mickroscopy", Vol. 2 (Jerusalem), S. 524-526.

Tischendorf, G.W., Zeichhardt, H., Stöffler, G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4820-4824.

Trempe, M.R., Ohgi, K., Glitz, D.G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9822-9829.

Turner, S., Noller, H.F. (1983) Biochemistry 22, 4159-4164.

Uchida, T., Bonen, I., Schaup, H.W., Lewis, B.J., Zablen, L., Woese, C.R. (1974) J. Mol. Evol. 3, 63-77.

Ulmer, E., Meinke, M., Ross, A., Fink, G., Brimacombe, R. (1978) Mol. Gen. Genet. 160, 183-193.

van Holde, K.E., Hill, W.E. (1974) In "Ribosomes" (M. Nomura,

A. Tissieres, P. Lengyel, Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory (New York), S. 53-92.

Vasiliev, V.D., Salinonova, O.M., Koteliansky, V.E. (1978) FEBS Lett. 95, 273-276.

Vasiliev, V.D., Zalite, O.M. (1980) FEBS Lett. 121, 101-104.

Vassilenko, S.K., Ryte, V.C. (1975) Biokhimiya 40, 578-583.

Vassilenko, S.K., Carbon, P., Ebel, J.P., Ehresmann, C. (1981) J. Mol. Biol. 152, 699-721

Volkaert, G., Fiers, W. (1977) Analyt. Biochem. 83, 228-239.

Wabl, M.R., Doberer, H.G., Höglund, S., Ljung, L. (1973) Cytobiologie 7, 111-115.

Weissbach, H., Pestka, S. (1977) Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis, Academic Press, New York.

Winkelmann, D.A., Kahan, L. (1983) J. Mol. Biol. 165, 357-374.

Wittmann, H.G. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51, 155-183.

Wittmann, H.G. (1983) Ann. Rev. Biochem. 52, 35-65.

Wittmann, H.G., Müssig, J., Piefke, J., Gewitz, H.S., Rheinberger, H.J., Yonath, A. (1982) FEBS Lett. 146, 217-220.

Whitfeld, P.R., Witzel, H. (1963) Biochim. Biophys. Acta 72, 335-338.

Woese, C.R., Gutell, R.R., Gupta, R., Noller, H.F. (1983) Microbiol. Reviews 47, 621-669.

Woese, C.R., Magrum, L.J., Gupta, R., Siegel, R.B., Stahl, D.A., Kop, J., Crawford, N., Brosius, J., Gutell, R.R., Hogan, J.J., Noller, H.F. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 2275-2293.

Wollenzien, P.L., Cantor, C.R. (1982a) J. Mol. Biol. 159, 151-166.

Wollenzien, P.L., Cantor, C.R. (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3940-3944.

Wollenzien, P.L., Hearst, J.E., Thammana, P., Cantor, C.R. (1979) J. Mol. Biol. 135, 255-269.

Wollenzien, P.L., Murphy, R.F., Cantor, C.R. (1985) J. Mol. Biol. 184, 67-80.

Wower, I., Brimacombe, R. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 1419-1436.

Wower, J., Maly, P., Zobawa, M., Brimacombe, R. (1983) Biochemistry 22, 2339-2346.

Ycas, M. (1969) The Biological Code, Wiley-Interscience, New York.

Yonath, A., Bartunik, H.D., Bartels, K.S., Wittmann, H.G. (1984) J. Mol. Biol. 177, 201-206

Yonath, A., Müssig, J., Wittmann, H.G. (1982) J. Cell Biochem. 19, 145-155.

Zantema, A., Maassen, J.A., Krick, J., Möller, W. (1982a) Biochemistry 21, 3077-3082.

Zantema, A., Maassen, J.A., Möller, W. (1982b) Biochemistry 21, 3069-3076.

Zeichhardt, H. (1976) Dissertation, Freie Universität Berlin.

Zimmermann, R.A. (1980) In "Ribosomes: Structure, Function and Genetics" (G. Chambliss., G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura), University Park Press, Baltimore, S. 135-169.

Zwieb, C., Brimacombe, R. (1979) Nucl. Acids Res. 6, 1775-1790.

Zwieb, C., Brimacomnbe, R. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 2397-2412.

Zwieb, C., Glotz, C., Brimacombe, R. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 3621-3640.

Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M., Brimacombe, R. (1978) Nucl. Acids Res. 5, 2705-2720.

DANKSAGUNG

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Dr. R. Brimacombe für seine ständige Diskussionsbereitschaft und fachkundige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann danke ich für seine großzügige Unterstützung und die guten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung. Herrn Prof. Dr. V.A. Erdmann danke ich für die Überlassung der Ribonuklease V_1.

Herrn Dr. W. Stiege, auf dessen Vorarbeiten ich zurückgreifen konnte, danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit ebenso wie den anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe.

Schließlich danke ich Frau J. Belart, die die Reinschrift dieser Arbeit so sorgfältig erledigte, und Frau U. Liebing und Frau M. Shevack für die Anfertigung der Fotographien und Zeichnungen.

LEBENSLAUF

7.11.1950	geboren in Kalisat (Java/Indonesien)
1956 - 1962	Besuch der Volksschule in Surabaya/Indonesien
1962 - 1965	Besuch der Mittelschule in Surabaya/Indonesien
1965 - 1968	Besuch des Gymnasiums in Surabaya/Indonesien
1968	Abitur
1969 - 1971	Deutschkurs und Studienkolleg an der Universität München
ab 1971	Chemie-Studium an der Technischen Universität Berlin
1974	Vordiplom in Chemie
ab 1975	Lebensmittelchemie-Studium an der Technischen Universität Berlin
1979	Staatsexamen in Lebensmittelchemie
ab 1980	Biochemie-Studium an der Freien Universität Berlin
1983	Diplom in Biochemie, Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem, bei Herrn Dr. R. Brimacombe, Abt. Prof. Dr. H.G. Wittmann
1982 - 1985	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem, bei Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann und Herrn Dr. R. Brimacombe